

**Maria Beatriz Ribeiro de Andrade**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PRECOCE DA ORQUIECTOMIA  
RADICAL UNILATERAL NO PERFIL DE PROTEÍNAS DO  
PLASMA SEMINAL DE HOMENS PORTADORES DE TUMOR  
DE CÉLULAS GERMINATIVAS DE TESTÍCULO**

Tese de Doutorado apresentada à  
Universidade Federal de São Paulo –  
Escola Paulista de Medicina, para  
obtenção do título de doutor em Ciências.

SÃO PAULO

2019

**Maria Beatriz Ribeiro de Andrade**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PRECOCE DA ORQUIECTOMIA  
RADICAL UNILATERAL NO PERFIL DE PROTEÍNAS DO  
PLASMA SEMINAL DE HOMENS PORTADORES DE TUMOR  
DE CÉLULAS GERMINATIVAS DE TESTÍCULO**

Tese de Doutorado apresentada à  
Universidade Federal de São Paulo –  
Escola Paulista de Medicina, para  
obtenção do título de doutor em Ciências.

**Orientador:** Profa. Dra. Deborah  
Montagnini Spaine.

**Co-orientador:** Prof. Dr. Ricardo Pimenta  
Bertolla.

SÃO PAULO

2019

Andrade, Maria Beatriz Ribeiro de

**Avaliação do efeito precoce da orquiectomia radical unilateral no perfil de proteínas do plasma seminal de homens portadores de tumor de células germinativas de testículo** / Maria Beatriz Ribeiro de Andrade. – São Paulo, 2019.

xiv, 70f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Urologia.

Título em inglês: Evaluation of the early effect of unilateral radical orchiectomy in the seminal plasma proteomic profile of men with testicular germ cell tumors.

1. Espectrometria de massas 2. Espermatozoides 3. Neoplasias testiculares  
4. Orquiectomia 5. Plasma seminal 6. Proteômica.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**  
**DISCIPLINA DE UROLOGIA**

**Chefe do Departamento:** Prof. Dr. José Carlos Costa Baptista Silva

**Chefe da Disciplina:** Prof. Dr. Agnaldo Pereira Cedenho

**Coordenador do Curso de Pós-graduação:** Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla

**Maria Beatriz Ribeiro de Andrade**

**Avaliação do efeito precoce da orquiectomia radical unilateral no perfil de proteínas do plasma seminal de homens portadores de tumor de células germinativas de testículo.**

Presidente da banca:

Profa. Dra. Deborah Montagnini Spaine

Banca examinadora:

Prof. Dr. Edson Borges Jr.

Prof. Dr. Daniel Suslik Zylbersztejn

Profa. Dra. Letícia Signori de Castro

Profa. Dra. Thaís Regiani Cataldi

## **Dedicatória**

*Aos meus pais Yvone Marcondes Ribeiro de Andrade e Fernão Cesar Ribeiro de Andrade que, com muito amor, carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.*

*A minha avó Angelina Marcondes de Godoy por sempre me apoiar e me tratar com todo amor e carinho, dando leveza aos momentos difíceis da minha vida.*

*A minha tia Sílvia Maria Ribeiro de Andrade Soares (in memoriam), pelo incentivo, admiração e afeto que serviram de estímulo em cada etapa da minha vida acadêmica.*

## **Agradecimentos**

Ao **Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla**, coordenador do programa de Pós-Graduação em Urologia da UNIFESP, pela oportunidade de desenvolver este projeto.

Aos **Professores Dra. Deborah Montagnini Spaine e Dr. Ricardo Pimenta Bertolla**, pela orientação e co-orientação, pela competência e disponibilidade na orientação desse trabalho e pela imensa oportunidade de aprendizado e crescimento profissional. Dedico meu respeito e admiração e a minha eterna gratidão.

As amigas e profissionais do Laboratório de Andrologia da UNIFESP, **Valéria Barradas e Carolina Homs**, pela amizade e pela ajuda diária e disponibilidade em ajudar na obtenção das amostras deste estudo.

À **Danielle Spínola Tibaldi**, pela amizade e por toda ajuda no recrutamento e na obtenção das amostras dos pacientes com tumor de células germinativas do testículo.

A todos os Pós-graduandos do Centro de Pesquisa em Urologia da UNIFESP: **Luana Nayara Adami, Renata Carvalho, Letícia Kaory Tamashiro, Karla Pacheco de Melo, Dóris Ferreira Moriyama, Gabrielle Ferrante Alves de Moraes, Rosana Xavier Souza, Valter Luiz Maciel Júnior, Marcela de Oliveira Pinheiro** que direta e indiretamente, colaboraram para a execução deste trabalho.

À **Larissa Berloff Belardin, Mariana Pereira Antoniassi, Paula Intasqui Lopes e Mariana Camargo** pela amizade e ajuda em todos os experimentos.

Aos meus **pais, irmã, sobrinha e avó** por estarem sempre presentes me apoiando, e provando assim, que são o alicerce da minha vida.

À **Deus**, por me dar forças para seguir em frente e acreditar que sou capaz de fazer corretamente.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo auxílio financeiro, sem o qual não seria possível realizar esta pesquisa.

À **Chamada Fleury de Projetos**, do Grupo Fleury, pelo apoio na realização da análise proteômica das amostras.



*“Vencer a si próprio é a maior das vitórias.”*

*(Platão)*

## SUMÁRIO

Lista de figuras .....	X
Lista de quadros .....	XI
Lista de tabelas .....	XII
Resumo .....	XIII
Abstract .....	XIV
1. Introdução .....	01
2. Objetivo .....	06
3. Método .....	07
3.1. Pacientes e coleta das amostras .....	07
3.2. Desenho do estudo .....	08
3.3. Análise dos parâmetros seminais .....	09
3.4. Análise estatística dos parâmetros seminais .....	11
3.5. Separação do plasma seminal .....	12
3.6. Análise proteômica do plasma seminal .....	12
3.6.1. Determinação da concentração total das proteínas .....	12
3.6.2. Digestão das proteínas do plasma seminal .....	13
3.6.3. Marcação de peptídeos por isótopos estáveis .....	14
3.6.4. Análise por LC-MS/MS .....	14
3.6.5. Processamento dos espectros .....	16
3.6.6. Análise dos dados proteômicos .....	16
4. Resultados .....	18
4.1. Análise descritiva dos homens com TCGT .....	18
4.2. Análise dos parâmetros seminais antes e após a orquiectomia .....	18
4.3. Análise proteômica do plasma seminal antes e após a orquiectomia .....	20
5. Discussão .....	21
6. Conclusão.....	30
Referências .....	31
Anexos .....	42

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Linha do tempo da coleta das amostras dos pacientes .....	08
<b>Figura 2.</b> Desenho do estudo .....	09
<b>Figura 3.</b> Placa de BCA para a quantificação das proteínas totais do plasma seminal de homens com TCGT pré e pós-orquiectomia .....	13

## Lista de quadros

<b>Quadro 1.</b> Classificação simplificada de Tumor de Célula Germinativa de Testículo (TCGT), baseado na classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2016 .....	01
--	----

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Análise descritiva dos homens com TCGT inseridos no estudo.....	18
<b>Tabela 2.</b> Análise das variáveis seminais em pacientes com TCGT nos períodos pré e pós-orquiectomia. As amostras foram comparadas pelo teste T de <i>Student</i> pareado .....	19
<b>Tabela 3.</b> Proteínas hiperexpressas nos grupos pré e pós-orquiectomia. Valores de <i>Fold-change</i> menores que 1 indicam hiperexpressão no grupo Pré-orquiectomia e valores de <i>Fold-change</i> maiores que 1 indicam hiperexpressão no grupo Pós-orquiectomia. Análise estatística: teste T de <i>Student</i> para amostra única .....	20

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar o efeito da orquiectomia na análise seminal e no perfil de proteínas do plasma seminal de homens com tumor de células germinativas de testículo.

**Métodos:** Estudo prospectivo realizado com amostras seminais de 17 homens portadores de TCGT fornecidas antes da orquiectomia e em até 30 dias após a cirurgia. Após a liquefação do sêmen, uma alíquota foi utilizada para a análise seminal, e outra alíquota foi centrifugada para a coleta do plasma seminal, que foi utilizado para a análise proteômica. O volume remanescente foi criopreservado. Para a análise seminal foi realizado o teste T de *Student* para amostras pareadas e para a análise proteômica o teste T de *Student* para amostra única. Em ambos os testes foi adotado um  $p < 0,05$ . O tamanho do efeito foi calculado pelo coeficiente de Cohen d para ambas as análises. **Resultados:** Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na análise dos parâmetros seminais entre os períodos pré e pós-orquiectomia. Na análise proteômica, 207 proteínas foram identificadas e quantificadas com alta fidelidade, sendo que 13 estavam diferencialmente expressas entre os períodos, das quais 05 estavam hiperexpressas no grupo Pré-orquiectomia e 08 estavam hiperexpressas no grupo Pós-orquiectomia. **Conclusão:** A remoção do testículo afetado pelo tumor leva a alterações moleculares no plasma seminal.

**Palavras-chave:** Espectrometria de massas; Espermatozoides; Neoplasias testiculares; Orquiectomia; Plasma seminal; Proteômica.

## Abstract

**Objective:** To evaluate the effect of orchiectomy on the seminal plasma proteomic profile of men with testicular germ cell tumors. **Methods:** Seventeen men with Testicular Germ Cell Tumors provided one semen sample before (Pre-orchiectomy) and another 30 days after orchiectomy (Post-orchiectomy). Following liquefaction, an aliquot was used for semen analysis and other one was centrifuged for collection of seminal plasma. The remaining volume was cryopreserved. The seminal plasma was used to proteomic analysis. For semen analysis a Student's t-test for paired samples was used and to proteomic analysis a one sample Student's t-test was performed. For both analysis was adopted  $p < 0,05$ . Effect size was assessed using Cohen's d coefficient. **Results:** No significant difference was observed in semen analysis. Two hundred and seven proteins were identified and quantified with high fidelity, of which five were increase in the pre-orchiectomy period and eight proteins were increase in post-orchiectomy period. **Conclusion:** Removal of the affect testis alters the seminal plasma molecular environment.

**Key-words:** Mass Spectrometry; Orchiectomy; Proteomics; Seminal Plasma; Spermatozoa; Testicular neoplasm.

## 1. INTRODUÇÃO

O tumor de testículo, apesar de raro, representa cerca de 1 a 2% dos tumores que acometem indivíduos do sexo masculino (1). Em 2018, estimou-se o aparecimento de 71.105 novos casos em todo o mundo e 9.507 mortes em decorrência dessa doença (2). No Brasil, em 2015, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou 259 mortes como consequência do câncer de testículo (3). Entretanto, devido à possibilidade de um diagnóstico mais precoce e sua radio e quimiosensibilidade, o câncer de testículo é altamente curável, apresentando uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 95% dos casos em um período de 5 anos sem recidiva clínica da doença (4,5).

Os tumores de testículo podem ser classificados em germinativos, que representam 95% dos casos e não germinativos, que representam 5% dos casos (6–8). Em 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu uma nova classificação para os tumores de células germinativas de testículo (TCGT), que passaram a ser divididos em dois diferentes grupos: os derivados de neoplasia *in situ* de células germinativas (GCNIS), que compreendem o seminoma e não-seminoma, e os que não são derivados de GCNIS (quadro 1) (9).

**Quadro 1.** Classificação simplificada de Tumor de Células Germinativas de Testículo (TCGT), baseado na classificação da OMS 2016.

TCGT derivados de GCNIS	TCGT não derivados de GCNIS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• GCNIS</li> <li>• Seminoma puro</li> <li>• Não-seminoma puro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumor espermatocítico</li> <li>• Teratomas (pré-pubere)</li> <li>• Tumor de Saco Vitelino (pré-pubere)</li> <li>• Tumores pré-pubere mistos</li> </ul>
Carcinoma embrionário	
Tumor de Saco Vitelino (pós-puberal)	
Tumores Trofoblasticos	
Teratoma (pós-puberal)	
Não seminomas mistos	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regresso de TCGT</li> </ul>	

Os tumores de células germinativas seminomatosos representam cerca de 60% dos casos e acometem indivíduos entre 25 e 40 anos de idade (6,7,10), são menos agressivos, apresentam uma composição celular mais homogênea e são mais sensíveis a radio e quimioterapia (10–13). Em relação aos tumores de células



germinativas não seminomatosos, são constituídos por carcinoma embrionário, teratocarcinoma, teratomas e coriocarcinomas, mais agressivos, quimiosensíveis e pouco radiosensível, e correspondem a 30% dos casos e acometem indivíduos entre 20 e 35 anos de idade (6,7,10,12–14) e por fim, os tumores mistos (contém elementos de seminoma e não-seminoma que correspondem a 10% dos casos de tumores germinativos (10). O tumor de células germinativas de testículo, independente da linhagem, pode comprometer a espermatogênese e levar a alterações nas variáveis seminais, como diminuição da concentração dos espermatozoides e até mesmo a ausência total de espermatozoides no ejaculado (15–19). Além disso, homens portadores de TCGT apresentam um aumento nos níveis do hormônio folículo-estimulante (FSH), diminuição de inibina B e de testosterona (17,20).

O TCGT tem como origem a neoplasia *in situ* de células germinativas (GCNIS) (21,22), chamada anteriormente de carcinoma in situ (CIS) ou neoplasia de células germinativas intratubulares não classificada (ITGCNU). Acredita-se que o GCNIS origina-se de gonócitos fetais, que em decorrência de uma sinalização anormal ou incapacidade de responder corretamente aos sinais, sofrem uma parada no desenvolvimento, não se diferenciando em espermatogônias (23,24). Essas células continuam a expressar marcadores de pluripotência, não sofrendo diferenciação, continuando em repouso até a puberdade (23,24).

No período de inatividade, as células GCNIS podem acumular aberrações cromossômicas, afetando assim, os genes que estão envolvidos na proliferação e diferenciação celular, levando-os a um crescimento descontrolado e um potencial maligno, em coincidência com a puberdade, quando os sinais de crescimento e os hormônios produzidos pelas células de Sertoli e de Leydig induzem um crescimento proliferativo maligno das células GCNIS (23,24). Estudos prévios demonstraram numerosas associações entre o tumor de células germinativas de testículo e seu precursor, as células GCNIS. Entre essas associações podemos citar marcadores pluripotentes, como OCT 3/4 e NANOG, que são expressos de forma similar por gonócitos fetais e em células GCNIS (25–27). Estima-se que 70% dos homens com GCNIS positivos irão desenvolver TCGT dentro de sete anos, com uma média de idade no momento do diagnóstico de 35 anos (28).

O seminoma assemelha-se morfológicamente à sua célula precursora, as células GCNIS (29–32), enquanto que o não seminoma se desenvolve quando as células GCNIS ou as células seminoma são reprogramadas em carcinoma embrionário (EC), versão neoplásica das células-tronco embrionárias (9,33). As células EC são células-tronco pluripotentes de não seminoma, capazes de produzir componentes extraembrionários, como tumor de saco vitelino, coriocarcinoma e células trofoblásticas gigantes. Elementos esses que constituem o não seminoma. Entretanto, o motivo pelo qual as células GCNIS ou seminoma sofrem essa reprogramação ainda permanece desconhecido (9,33).

O tumor de células germinativas de testículo é considerado o resultado da diferenciação alterada de células germinativas e pode estar associado à Síndrome da Disgenesia Testicular (SDT) (34,35), síndrome essa resultado do desenvolvimento fetal anormal das gônadas masculinas, devido a fatores genéticos ou ambientais (34,35). Os vários aspectos associados a essa síndrome como, malformação gonadal, microlitíase testicular, criptorquidismo, TCGT prévio no testículo contralateral, desordens do desenvolvimento sexual, infertilidade ou hipospádia foram congruentes com o risco aumentado de TCGT (34,35).

Ademais, o histórico familiar e fatores ambientais também podem estar associados com o desenvolvimento de Tumor de Células Germinativas de Testículo (33). O aumento de 4-10 vezes no risco em apresentar TCGT entre irmãos, filhos de homens afetados, juntamente com achados em estudos realizados em gêmeos sustentam uma forte contribuição genética para a susceptibilidade ao TCGT (36–38). Além disso, uma exposição excessiva ao estrógeno, a moléculas com atividades estrogênicas e a disruptores endócrinos durante a gravidez pode aumentar o risco de desenvolver TCGT (33,39).

O diagnóstico de TCGT baseia-se principalmente em exame físico, ultrassonografia da bolsa testicular, ressonância magnética, biópsia testicular e medição dos níveis séricos dos marcadores tumorais (8,39–42). Os marcadores séricos tumorais são importantes tanto para o diagnóstico como estadiamento e recidiva da doença, sendo os principais a Alfa-fetoproteína (AFP), Fração Beta da Gonadotrofina Coriônica ( $\beta$ hCG) e Desidrogenase Láctica (DHL) (43). Entretanto, esses marcadores não são muito específicos e são detectados em apenas 60%

dos homens com tumor de testículo. Além disso, sua sensibilidade é limitada, apresentando níveis normais em cerca de 40% dos homens com recorrência da doença (44).

A intervenção terapêutica inicial padrão para homens portadores de TCGT é a orquiectomia radical via inguinal (8,14,42,45). Após esse procedimento, esses homens podem ou não receber a indicação para tratamentos adjuvantes, como quimioterapia e/ou radioterapia e/ou linfadenectomia retroperitoneal (8,14). Estudos presentes na literatura demonstraram que a orquiectomia pode exercer um efeito negativo na produção de espermatozoides, levando a uma diminuição da concentração dos espermatozoides (46,47).

Entretanto, um estudo recém-publicado, realizado por nosso grupo demonstrou que após a remoção do tumor, por meio da orquiectomia, observou-se em uma média de 34 dias após a cirurgia, uma diminuição da fragmentação do DNA dos espermatozoides, diminuição dos níveis de peroxidação lipídica do plasma seminal e um aumento da atividade mitocondrial dos espermatozoides (48). Com esse achado é possível observar um efeito benéfico da remoção do testículo afetado, na qualidade dos espermatozoides, uma vez que a orquiectomia foi provavelmente capaz de diminuir os agentes estressores, como a inflamação local em decorrência da presença do tumor. Assim uma melhora na qualidade funcional dos espermatozoides presentes no epidídimo e em aqueles que já estavam em estágio final da espermatogênese foi observada. No entanto, as alterações moleculares ocasionadas tanto pelo tumor quanto por sua retirada, por meio da orquiectomia, no ambiente testicular ainda são pouco conhecidas.

A análise das proteínas presentes no plasma seminal é de extrema valia quando se trata estudar as alterações moleculares ocasionadas no ambiente testicular, uma vez que, cerca de 10% das proteínas existentes no plasma seminal são provenientes dos testículos e epidídimos, seguidos de 25% da próstata e 65% das vesículas seminais (49). Ademais, alguns estudos demonstraram que proteínas epididimárias têm um papel importante na qualidade dos espermatozoides (49), e que proteínas associadas a alterações testiculares podem ser encontradas no plasma seminal (50–52). O plasma seminal é rico em proteínas (aproximadamente 35 e 55 g/L) o que torna essa fonte rica e acessível para a

análise proteômica (50). O proteoma é descrito como a identificação e quantificação de todas as proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo, em determinada condição biológica com o objetivo de entender as funções, interações e contribuições das proteínas para os processos biológicos (53).

Sabe-se que as células tumorais se encontraram inicialmente confinadas dentro dos túbulos seminíferos, e em seguida se distribuem desordenadamente através do parênquima testicular. Dessa forma, pode-se assumir que as proteínas produzidas e secretadas pelo tumor fazem parte do fluído proveniente dos túbulos seminíferos e podem ser observadas no ejaculado. Sendo assim, as proteínas produzidas pelo tumor são potencialmente detectadas no sêmen desses homens. Destarte, a análise dessas proteínas pode fornecer um melhor entendimento das alterações no ambiente testicular ocasionadas pelo tumor.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar o efeito precoce da orquiectomia radical unilateral na análise dos parâmetros seminais e no perfil de proteínas do plasma seminal de homens com tumor de células germinativas de testículo.

### **3. MÉTODO**

#### **3.1. Pacientes e coleta das amostras**

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (bolsa CAPES) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (número do CAAE 60953616.2.0000.5505).

Para a realização deste estudo prospectivo, foram utilizadas amostras de 17 homens portadores de tumor de células germinativas de testículo (seminomatoso (n=06) e não seminomatoso (n=11)) antes e até 30 dias após orquiectomia. Foram incluídos no estudo, pacientes encaminhados para criopreservação da amostra seminal ao Banco de Células e Tecidos Germinativos do Setor Integrado de Reprodução Humana do Hospital São Paulo no período entre fevereiro de 2014 e agosto de 2015. Foi estabelecido um período de até 30 dias para a realização da coleta após a orquiectomia devido ao fato de que a maioria dos pacientes precisava iniciar o tratamento adjuvante (químico e/ou radioterapia) o mais rápido possível. As amostras foram colhidas em recipientes de polipropileno estéreis, por masturbação, após dois a cinco dias de abstinência ejaculatória, em área anexa ao laboratório de Andrologia, da Disciplina de Urologia, do Departamento de Cirurgia, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) (Figura 1). Foram excluídos desse estudo homens azoospermicos, com histórico de orquiectomia, diagnóstico de tumor de testículo bilateral e que já tinham iniciado tratamento quimioterápico e/ou radioterápico. Por se tratar de homens provenientes de origens distintas, e que eram encaminhados para o setor apenas para a criopreservação da amostra seminal e, por ser um estudo pareado, não foram adotados mais critérios de exclusão

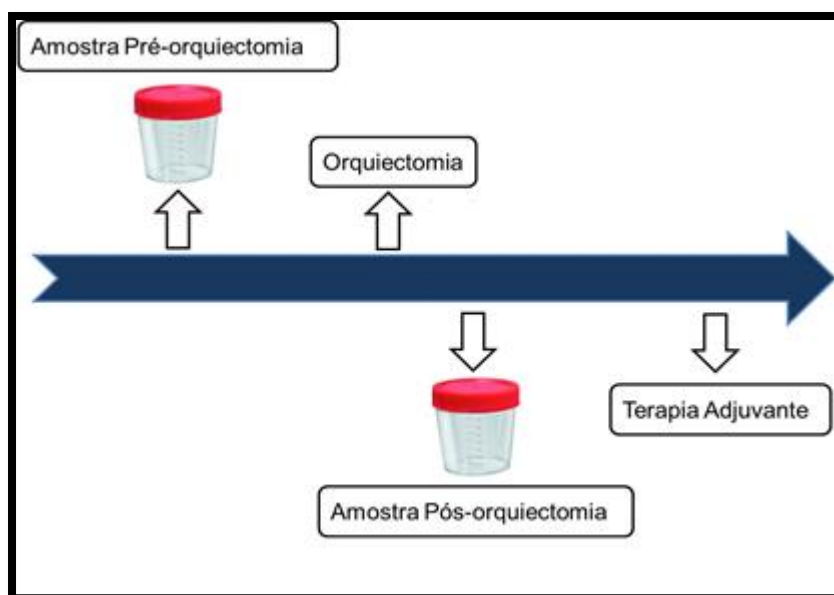


Figura 1. Linha do tempo da coleta das amostras dos pacientes.

### 3.1. Desenho do estudo

Após a coleta e liquefação da amostra seminal, uma alíquota foi utilizada para análise dos parâmetros seminais, realizada de acordo com as recomendações do manual da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2010 (54). Após a realização do espermograma outra alíquota da amostra seminal foi centrifugada a 800 xG por 30 minutos para separar os espermatozoides do plasma seminal, que foi congelado e armazenado até o momento de sua utilização para a análise proteômica. O volume restante da amostra seminal foi criopreservado em nitrogênio líquido (Figura 2).

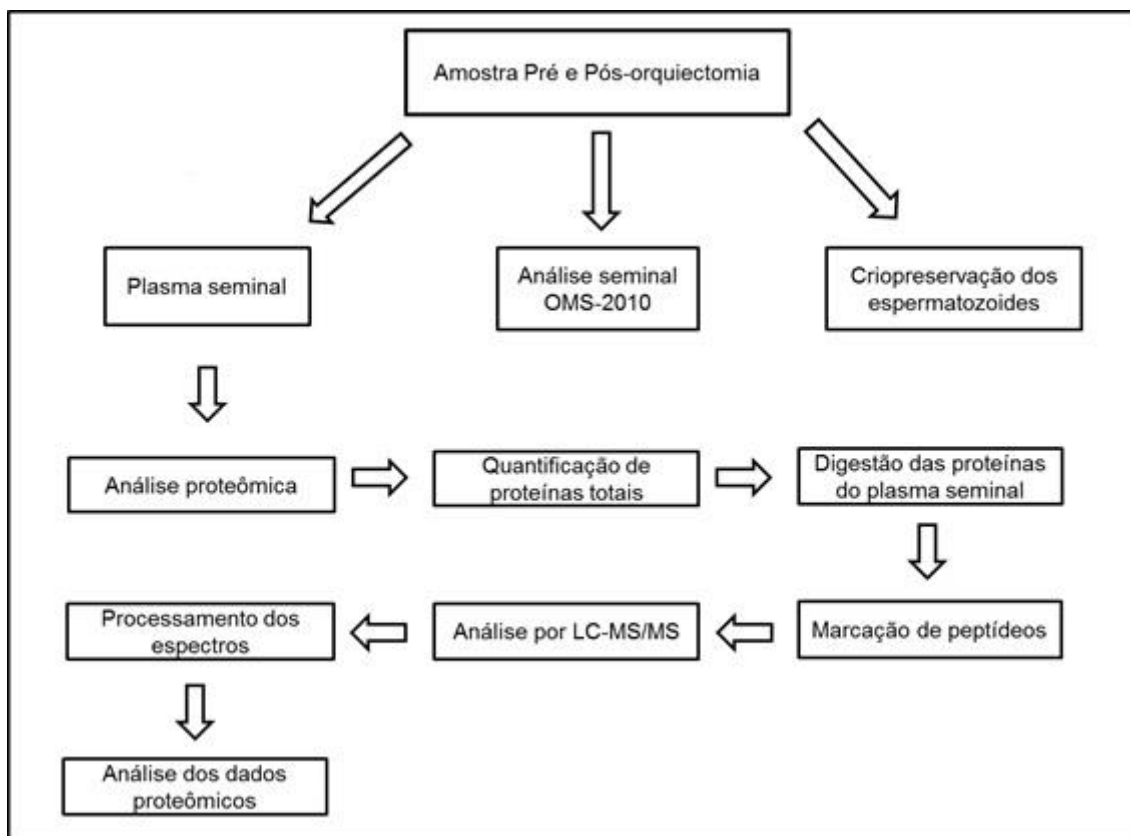


Figura 2. Desenho do estudo.

### 3.3. Análise dos parâmetros seminais

A análise seminal foi realizada segundo os critérios do manual da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2010) (54). O volume do ejaculado foi medido com auxílio de uma pipeta sorológica graduada, de 5 mL (Corning®, EUA), acoplada a um dispositivo de borracha (pêra de borracha com 3 válvulas; J. Prolab®, Brasil), mediante aspiração de toda a amostra. O volume da amostra foi expresso em mililitros. Após a liquefação da amostra seminal, uma alíquota de 10 µL de sêmen foi depositada no centro de uma câmara de contagem de Horwell (Arnold R. Horwell Limited®, Londres) e coberta com uma lamínula (24 x 24 mm) para contagem de 100 espermatozoides, diferenciando-os de acordo com a seguinte classificação: PR: espermatozoides progressivos, NP: espermatozoides não progressivos e IM: espermatozoides imóveis. Foram realizadas, no mínimo, duas leituras para cada amostra, em microscópio óptico de contraste de fase (Nikon® Eclipse E400, Japão), em magnificação de 400 vezes. Para o resultado, foi considerada a média das leituras, desde que se enquadrassem no gráfico de diferenças aceitáveis do manual da OMS (54).



A concentração de espermatozoides, expressa em milhões por mililitro de ejaculado, foi determinada utilizando uma câmara de Neubauer modificada (Herka<sup>®</sup>, Alemanha). Na câmara de Neubauer foram depositados 10 µL da amostra diluída no quadrante superior e no quadrante inferior. A leitura foi realizada em microscópio óptico de contraste de fase (Nikon<sup>®</sup>, Eclipse E400, Japão), em uma magnificação de 400 vezes. O cálculo da concentração final foi realizado dividindo-se o número de espermatozoides contados nos quadrantes pelo fator de correção da câmara fornecido pelo manual da OMS. Para o resultado, foi considerada a média das leituras, desde que se enquadrassem no gráfico de diferenças aceitáveis do manual da OMS.

A avaliação da vitalidade foi realizada nas amostras que apresentaram a soma das porcentagens de motilidade progressiva (PR) e não progressiva (NP) inferior a 40%. Foram homogeneizadas alíquotas de 20 µL de sêmen e 20 µL do corante eosina-nigrosina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup> - *Eosin* Y 11.983-0 / *Nigrosin* N4763, St Louis, EUA) e após aproximadamente 2 minutos de reação, foi realizado um esfregaço em lâmina de microscopia. Decorrido o tempo de secagem, a leitura da lâmina foi realizada em microscópio óptico de contraste de fase (Nikon<sup>®</sup> Eclipse E400, Japão), em magnificação de 1000 vezes, em imersão. Foram considerados vivos os espermatozoides nos quais não houve penetração do corante (brancos), e mortos aqueles em que houve penetração do corante (rosas). O resultado foi expresso em porcentagem de espermatozoides vivos.

Os aspectos morfológicos dos espermatozoides foram classificados de acordo com o critério estabelecido por Kruger et al (55). Para a realização do esfregaço, uma alíquota de 5 µL de sêmen liquefeito foi depositado em uma lâmina de vidro e colocada em estufa a 37°C, para a fixação do material. O esfregaço foi corado pelo kit panótico rápido (Laborclin<sup>®</sup>, Brasil). Depois de secas, as lâminas foram lidas em microscópio óptico de contraste de fase (Nikon<sup>®</sup> Eclipse E400, Japão) em magnificação de 1000 vezes (imersão). Foram realizadas, no mínimo, duas contagens de 100 espermatozoides, e o resultado (média das leituras) foi expresso em porcentagem de células normais.

A concentração de células redondas foi determinada pelo preenchimento, por capilaridade, da câmara de Neubauer modificada (Herka<sup>®</sup>, Alemanha), com uma

alíquota de 10  $\mu$ L de sêmen previamente diluída em solução salina 0,9%, e os 25 quadrantes foram contados. Foram realizadas duas leituras em microscópio óptico de contraste de fase (Nikon® Eclipse E400, Japão), em magnificação de 400 vezes. O resultado (média das leituras) foi expresso em milhões de células redondas por mililitro de ejaculado.

Para a contagem de neutrófilos da amostra seminal realizou-se um procedimento imunohistoquímico utilizado para detecção de leucócitos no sêmen humano, o teste de peroxidase. Para isso, uma alíquota de sêmen foi misturada a uma solução de peroxidase (Benzidina-Cianosina, Sigma-Aldrich®, EUA), em uma lâmina de vidro (Perfecta®, China), e recoberta por lamínula. Após 7 minutos de incubação, à temperatura ambiente, foram contadas 200 células em microscópio óptico de contraste de fase (Nikon® Eclipse E400, Japão), em magnificação de 400 vezes. As células foram classificadas em peroxidase positiva (coradas em marrom) e peroxidase negativa (coradas em rosa). O número de neutrófilos foi calculado, multiplicando-se o número de células redondas presentes na amostra pela porcentagem de células peroxidase positivas. O resultado foi expresso em milhões de neutrófilos por mililitro de ejaculado.

### **3.4. Análise estatística dos parâmetros seminais**

Para a análise estatística, foi utilizado o programa SPSS® 18.0 para Windows® (SPSS, EUA). Inicialmente, foi verificado se as variáveis apresentavam distribuição normal, através do teste Kolmogorov-Smirnov. Os dados que não obedeceram a essa premissa foram transformados pelo seu valor em raiz. As variáveis que ainda assim não obedeceram à normalidade foram comparadas através do teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas. Para estas variáveis, os dados foram apresentados sob a forma de mediana, intervalo interquartil e primeiro e terceiro quartil. Para as variáveis que obedeceram à distribuição normal, os grupos foram comparados através do teste t de *Student* para amostras pareadas e os dados apresentados sob a forma de média, desvio padrão e intervalo de confiança de 95% da média. Foi adotado um  $\alpha$  de 5%. O tamanho do efeito foi calculado pelo coeficiente de *Cohen d*, onde o tamanho do

efeito foi considerado fraco quando abaixo de 0,25, médio quando  $d=0,5$  e alto quando  $d=0,8$

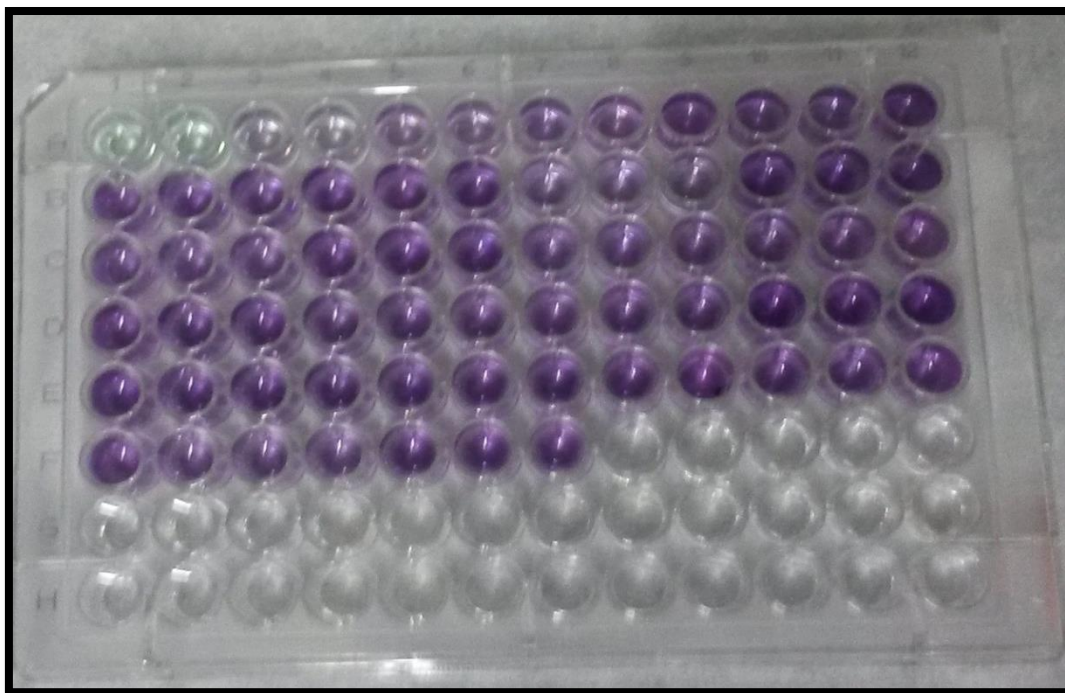
### **3.5. Separação do plasma seminal**

Após a realização da análise seminal, uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  foi centrifugado a 800 xG por trinta minutos para a separação do plasma seminal da fração celular. O sobrenadante foi congelado e mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise proteômica. Previamente ao teste, o plasma seminal foi descongelado e centrifugado a 16100 xG por uma hora a  $4^{\circ}\text{C}$  para remoção de debris celulares. Todos os reagentes utilizados nesse estudo foram adquiridos da Sigma (Sigma Aldrich®, EUA), a não ser quando descrito.

### **3.6. Análise proteômica do plasma seminal**

#### **3.6.1. Determinação da concentração total das proteínas**

A dosagem do total de proteínas do plasma seminal de cada amostra foi realizada por meio do método de Ensaio de Proteína BCA (Ácido Bicinconínico – Método de Lowry modificado) (56). A quantificação foi realizada por espectrofotometria, em leitor de microplaca (*Elx800 Absorbance Microplate Reader*, Biotek, Vermont, EUA) e em comprimento de onda de 540 nm. Cada amostra foi quantificada em triplicata e a curva padrão contendo diferentes concentrações de albumina sérica bovina (0 a 1.000 mg/mL), em duplicata (Figura 3). As amostras que apresentavam coeficiente de variação maior que 10% foram quantificadas novamente em outra corrida, para assegurar uma maior precisão na quantificação.



**Figura 3. Placa de BCA para a quantificação das proteínas totais do plasma seminal de homens com TCGT pré e pós-orquiectomia.**

### **3.6.2. Digestão das proteínas do plasma seminal**

Para cada amostra de cada período (pré e pós-orquiectomia), de cada paciente, primeiramente, no plasma seminal, um volume correspondente a 250  $\mu\text{g}$  de proteínas foi diluído em um volume final de 50  $\mu\text{L}$  em água Milli-Q. Em seguida, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de uma solução 50 nM TEAB (Trietilbicarbonato de amônio). Então, as amostras de proteínas foram desnaturadas em 0,2% de RapiGest SF em água (RapiGest SF, Waters, Illinois, EUA) e incubadas por 15 minutos a 80°C, para posterior centrifugação. Em seguida foi adicionado 2,5  $\mu\text{L}$  de DTT (Ditiotreitol) (GE Healthcare, Amersham Place, UK) a 100 mM. As amostras foram aquecidas a 60°C por 30 minutos, esfriadas à temperatura ambiente e novamente centrifugadas. Depois, foram adicionados 2,5  $\mu\text{L}$  de iodoacetamida a 300 mM (GE Healthcare, Amersham Place, UK) e as amostras foram incubadas por 30 minutos, em temperatura ambiente no escuro. A digestão foi realizada por meio da adição de 10  $\mu\text{L}$  de uma solução de tripsina (Promega, Wisconsin, EUA) em 50 nM de ácido acético, a uma razão de 1:100 enzima/proteína e a amostra foi incubada a 37°C, em banho-maria, por 16 horas. Após a digestão, foi realizada a hidrólise do RapiGest SF, por meio da adição de 10  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoracético 5% (Merck, Hohenbrunn,

Alemanha). As amostras foram incubadas a 37°C por 90 minutos e, após esse tempo, foram centrifugadas a 14000 xG por 30 minutos a 6°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga.

### 3.6.3. Marcação de peptídeos por isótopos estáveis

Após a digestão das proteínas, os peptídeos de cada período (pré e pós-orquiectomia) foram submetidos à reação de dimetilação com protocolo adaptado de da Camargo et al. (57). Dessa forma, aos peptídeos do período pré-orquiectomia foram adicionados 4 µL de 4% de solução de formaldeído (marcação leve – L), e aos peptídeos do período pós-orquiectomia, 4 µL 4% D<sub>2</sub>O (formaldeído marcado com <sup>13</sup>C e 2H) (marcação pesada – H). Então, as amostras de ambos os períodos foram homogeneizadas e centrifugadas. Em seguida, foi adicionado aos peptídeos do período pré-orquiectomia 4 µL de 4% cianoborohidreto de sódio (NaBH<sub>3</sub>CN) (marcação leve – L) e aos peptídeos do período pós-orquiectomia 4 µL de 4% cianoborohidreto de sódio deuterado (NaBD<sub>3</sub>CN) (marcação pesada – H). As amostras foram incubadas por 1h sob agitação leve. Após esse tempo, foi adicionado aos peptídeos de ambos os períodos 16 µL de 1% amônia. Após a centrifugação, foram adicionados 8 µL de 5% ácido fórmico. Após homogeneização, foi adicionado ao frasco das respectivas amostras do período pré-orquiectomia, os peptídeos deuterados do período pós-orquiectomia (pareado), para que cada paciente obtivesse apenas um frasco com peptídeos, em proporção 1:1 (H:L). Por fim, as amostras foram transferidas para frascos de vidro (*total recovery vial*, Waters, Millford, MA, EUA).

### 3.6.4. Análise por LC-MS/MS

As análises por LC-MS/MS (Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas *in tandem*) foram conduzidas em duas fases: a primeira consiste no fracionamento *off-line* das amostras (primeira dimensão), que promove uma dessalinização das amostras e separa os peptídeos em frações por fase reversa em pH alto (MS). A segunda fase consiste na separação por fase reversa em pH baixo diretamente acoplada à detecção por espectrometria de massas (segunda dimensão) (58).

Desta forma, primeiramente, o fracionamento foi realizado em sistema UPLC (cromatografia líquida de ultraperformance) (*nanoAcquity Liquid Chromatographer*) (Waters, Massachusetts, EUA) de fase reversa. Então, 50 µL de peptídeos foram submetidos à eluição em gradiente linear mantido por 20 minutos de 0 a 100% de acetonitrila ultrapura e 20mM de formiato de amônio em pH 10 a 0,3 mL/min. Ao final, 3 frações foram obtidas. Então, os peptídeos fracionados foram acidificados e submetidos à concentração por *speed vac* até obter um volume final de amostra de 50 µL.

Na segunda fase, os experimentos de LC-MS/MS foram conduzidos utilizando um sistema *nanoUPLC* acoplado a um espectrômetro de massas híbrido *Quadrupolo-Orbitrap Thermo Q-Exactive* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) em alta resolução. O método de quantificação foi o dimetil *quantification* utilizando contagem espectral para construção de picos cromatográficos (para cálculos estequiométricos).

Para as corridas cromatográficas, 1 µL (equivalente a 0,25 µg de produtos de digestão triptica) foi carregado em uma coluna PST C18 nanoACQUITY (180 µm x 20 mm) em um fluxo de 15 µL/min de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v) durante três minutos. A separação analítica dos peptídeos foi realizada em uma coluna nanoACQUITY UPLC HSS C18 (1,8 µm, 75 µm x 150 mm). Um gradiente linear em dois passos foi utilizado, iniciando em 2% (v/v) dimetilsulfóxido (DMSO), 0,1% (v/v), ácido fórmico e atingindo 5% (v/v) DMSO, 25% (v/v) acetonitrila e 0,1% (v/v) ácido fórmico em sessenta minutos no primeiro passo, seguido de um gradiente de trinta minutos até atingir 5% (v/v) DMSO, 40% (v/v) acetonitrila e 0,1% (v/v) ácido fórmico.

Foi utilizada uma fonte de nano-eletrospray como método de ionização (modo positivo) e foram corridos experimentos em análise dependente de informação (IDA) com uma estratégia *Top Twelve*, em que os doze principais íons precursores gerados por MS (faixa de  $m/z$  390 a 1.650) foram selecionados para a fragmentação (*Higher-energy collisional dissociation – HCD*) em um analisador de massas quadrupolo para sequenciamento peptídico (em MS/MS). O espectrômetro operou em uma resolução de 70.000 (a  $m/z$  200) para as aquisições em MS e 17.500 (a  $m/z$  200) para as aquisições em MS/MS.

### 3.6.5. Processamento dos espectros

O processamento dos espectros foi realizado utilizando-se o *software* MaxQuant 1.5.5.1 e o sistema de busca Andromeda para identificação e quantificação proteica. Foram permitidas até duas clivagens perdidas pela tripsina. Para as modificações variáveis foram utilizadas oxidação de metionina e acetilação N-terminal de proteínas. A modificação fixa carbamidometil foi incluída devido à utilização do DTT seguido da iodoacetamida durante a digestão das proteínas. Os cromatogramas foram alinhados pelo *software*, permitindo até dois minutos (em cada direção) de distorção, a fim de maximizar a identificação dos espectros MS/MS. O banco de dados utilizado foi o *SwissProt* revisado (versão 206\_10, download em 10 de outubro de 2016, com 20.160 entradas e 13.065kb). Para cálculo de falso-positivos foi utilizado um banco de dados *reverse* (gerado automaticamente). Foi permitido um erro (*False Discovery Rate*) máximo de 1%.

### 3.6.6. Análise dos dados proteômicos

Após a digestão triptica das proteínas do plasma seminal e da marcação dos peptídeos por dimetil, ambas realizadas separadamente para cada período de coleta (pré e pós-orquiectomia) e para cada paciente, as amostras pré e pós-orquiectomia de cada paciente foram agrupadas individualmente, de forma que cada paciente apresentasse no experimento de LC-MS/MS uma única variável. Este processo permitiu coletar os dados de ambos os períodos de tempo em uma única corrida cromatográfica, com consequente redução na variação interensaios. As proteínas contaminantes e as identificadas apenas por sítios de modificações proteicas e/ou em bancos de dados de sequência reversa foram excluídas da análise.

A variável utilizada para a análise comparativa foi a proporção da quantificação por dimetil normalizados (variável H/L representa a quantificação dos períodos Pós/Pré e, quando apresenta valor menor que 1, está presente em maior quantidade no período pré-orquiectomia. As proteínas que não foram quantificadas (somente identificadas), e aquelas quantificadas em 2 ou menos pacientes por período foram excluídas da análise estatística. Para a comparação entre os períodos, foi realizado um teste t de Student para amostra única, adotando-se um  $\alpha=5\%$ , contra o valor de 1. O tamanho do efeito foi calculado pelo coeficiente de

*Cohen d* ,onde o tamanho do efeito foi considerado fraco quando abaixo de 0,25, médio quando  $d=0,5$  e alto quando  $d= 0,8$



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise descritiva dos homens com TCGT

Na **tabela 1** estão representados os valores de idade (anos), tempo decorrido desde cirurgia (dias), tipo histológico e estadiamento do tumor dos homens com Tumor de Células Germinativas de Testículo.

**Tabela 1.** Análise descritiva dos homens com TCGT inseridos no estudo.

	Frequência	Porcentagem (%)
<b>Idade (anos)</b>		
Média, DP	27,4; 7,1	
IC 95%	[22,90; 31,93]	
<b>Tempo desde Cirurgia (dias)</b>		
Média, DP	34,9; 11,7	
IC 95%	[28,46; 41,41]	
<b>Tipo histológico</b>		
Seminoma	6	35,30
Não seminoma	11	64,70
<b>Estadiamento</b>		
pT1	4	23,53
pT2	8	47,06
<b>Sem informação</b>	5	29,41

DP – Desvio padrão

IC 95% - Intervalo de confiança de 95% da média

pT1 – Tumor circunscrito ao testículo e epidídimo sem invasão vasculho-linfática

pT2 - Tumor circunscrito ao testículo e epidídimo com invasão vasculho-linfática ou da túnica vaginal.

### 4.2. Análise dos parâmetros seminais antes e após a orquiectomia

Na **tabela 2** estão representados os valores da análise seminal dos pacientes nos dois períodos de coleta, pré e pós-orquiectomia. Não houve diferença entre as variáveis seminais.

**Tabela 2.** Análise das variáveis seminais em homens com TCGT nos períodos pré e pós-orquiectomia (n= 17). As amostras foram comparadas pelo teste t de *Student* pareado.

	Pré orquiectomia	Pós orquiectomia	P	Coeficiente de Cohen d	Poder
<b>pH</b>					
Média; DP	8,3; 0,3	8,4; 0,4	0,269	0.277	0.189
IC 95%	[8,00;9,00]	[8,00;9,00]			
<b>Volume (mL)</b>					
Média; DP	2,4;1,1	3,0; 1,8	0,122	0.381	0.315
IC 95%	[7,00;5,00]	[6,00; 7,5]			
<b>Motilidade progressiva (%)</b>					
Média; DP	49,6;18,2	50,9; 12,4	0,767	0.080	0,061
IC 95%	[0,00;78,00]	[22,00; 70,00]			
<b>Motilidade não progressiva (%)</b>					
Média; DP	5,9;3,3	4,3; 1,3	0,074	0.555	0.576
IC 95%	[0,00;12,00]	[2,00; 7,00]			
<b>Imóveis (%)</b>					
Média; DP	44,5; 18,6	44,7; 11,7	0,962	0.012	0,050
IC 95%	[20,00;100,00]	[26,00; 72,00]			
<b>Vitalidade (%)</b>					
Média; DP	88,5;5,2	87,2; 9,5	0,695	0,157	0,093
IC 95%	[81,00;92,00]	[72,00; 95,00]			
<b>Concentração de sptz (<math>\times 10^6</math>/mL)</b>					
Média; DP	18,6; 18,1	13,1; 16,1	0,137	0,320	0.236
IC95%	[0,04;57,80]	[1,00; 63,80]			
<b>Contagem total de sptz (<math>10^6</math>)</b>					
Média; DP	44,1; 52,3	40,3; 51,4	0,720	0,073	0,059
IC 95%	[0,06; 190,70]	[2,00; 197,80]			
<b>Morfologia (%)</b>					
Média; DP	4,0; 2,3	4,1; 1,9	1,000	0,046	0,053
IC 95%	[1,00; 9,00]	[1,00; 7,00]			
<b>Concentração de células redondas (<math>\times 10^6</math>/mL)</b>					
Média; DP	1,5; 1,9	0,9; 0,8	0,134	0.363	0,290
IC 95%	[1,00; 7,70]	[0,00; 2,70]			
<b>Neutrófilos (<math>\times 10^6</math>/mL)</b>					
Média; DP	0,4; 0,7	0,3; 0,6	0,332	0,152	0,090
IC 95%	[0,00; 2,90]	[0,00; 2,60]			

DP – Desvio Padrão

IC 95% - Intervalo de confiança de 95% da média

#### 4.4. Análise proteômica do plasma seminal antes e após a orquiectomia

Neste estudo foram encontradas, no total, 546 proteínas. Destas, 339 proteínas foram excluídas por não serem quantificadas, apenas identificadas e que foram identificadas em 2 ou menos amostras. Ao final, 207 proteínas foram utilizadas para a análise estatística (apresentadas na tabela suplementar - Anexo 1). Das 207 proteínas, 13 estavam diferencialmente expressas entre os períodos, das quais, 5 estavam hiperexpressas no grupo Pré-orquiectomia e 8 estavam hiperexpressas no grupo Pós-orquiectomia. Na **tabela 4** encontram-se as proteínas diferencialmente expressas.

**Tabela 3.** Proteínas hiper-expressas no grupo pré-orquiectomia e no grupo pós-orquiectomia. Valores de *Fold-change* menores que 1 indicam hiper-expressão no grupo Pré-orquiectomia e valores de *Fold-change* maiores que 1 indicam hiper-expressão no grupo Pós-orquiectomia. Análise estatística: teste T de student para amostras únicas.

Uniprot ID	Proteína	<i>Fold-change</i>	p	Coefficiente de Cohen d	Poder
P08571	Monocyte differentiation antigen CD14	0,37	0,012	2,700	1,000
P48637	Glutathione synthetase	0,48	0,003	10,240	1,000
P55259	Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2	0,53	0,007	2.220	1,000
P15291	Beta-1,4-galactosyltransferase 1	0,60	0,008	1,7000	0,999
P02647	Apolipoprotein A-I	0,65	0,003	173,00	1,000
Q00796	Sorbitol dehydrogenase	1,25	0,044	0,546	0,574
P49221	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4	1,35	0,046	0,585	0,598
P09211	Glutathione S-transferase P	1,45	0,019	0,827	0,897
Q99497	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	1,56	0,045	0,686	0,734
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	1,63	0,040	0,540	0,531
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	1,81	0,044	0,569	0,574
O00507	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-Y	2,20	0,037	1,370	0,999
P07339	Cathepsin D	6,39	0,014	0,693	0,765

## 5. DISCUSSÃO

O Tumor de Células Germinativas de Testículo é uma doença que acomete indivíduos jovens e apresenta altos níveis de cura quando diagnosticado em estágio inicial (1,2,4,5). Sabe-se que a orquiectomia, tratamento inicial padrão para todos os homens portadores de TCGT, foi capaz de levar ao aumento na atividade mitocondrial dos espermatozoides, diminuição da fragmentação do DNA dos espermatozoides e diminuição nos níveis de peroxidação lipídica do plasma seminal em uma média de 34 dias após a sua realização, mesmo quando não observado alterações nos parâmetros seminais (48). Assim, hipotetizou-se, que a intervenção cirúrgica foi capaz de remover os agentes estressores (processo inflamatório e hipóxia) presentes no ambiente testicular que culminavam em alterações da qualidade funcional dos espermatozoides. Entretanto, o mecanismo pelo qual o tumor e sua retirada cirúrgica, por meio da orquiectomia, corroboram para as alterações no ambiente testicular ainda permanecem desconhecidos. Dessa forma, o presente estudo avaliou os efeitos iniciais da orquiectomia radical unilateral no perfil de proteínas do plasma seminal de homens portadores de TCGT.

No presente estudo, além da análise proteômica do plasma seminal também foi realizada uma análise das variáveis seminais entre os períodos pré e pós-orquiectomia. Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa nos parâmetros seminais entre os períodos. Estudos presentes na literatura (46,47), observaram que após a orquiectomia os homens portadores de tumor de células germinativas de testículo apresentaram uma diminuição na concentração e contagem total de espermatozoides. Entretanto, nesses estudos não é especificado quanto tempo após a orquiectomia foi realizada a coleta da amostra seminal para avaliação de sua qualidade. De fato, em uma média de 34 dias após a realização da cirurgia, é pouco comum se observar uma alteração nos parâmetros seminais, uma vez que, o ciclo de espermatogênese dura em média 40-76 dias. Dessa forma, o ideal seria realizar o espermograma 3 meses após a realização da orquiectomia nesses homens. No entanto, a maior parte deles tinha a necessidade de iniciar o tratamento adjuvante,

químico e/ou radioterapia, rapidamente. Impossibilitando dessa forma a coleta da amostra seminal após decorridos 3 meses da cirurgia.

Neste estudo, 207 proteínas foram quantificadas e identificadas sendo que, 13 proteínas apresentaram-se diferencialmente expressas entre os grupos. Dentre as quais, 5 proteínas estavam hiperexpressas no grupo pré-orquiectomia e 8 proteínas estavam hiperexpressas no grupo pós-orquiectomia. As proteínas hiperexpressas no período pré-orquiectomia foram; *Monocyte differentiation antigen CD14 (CD14)*, *Glutathione synthetase (GSHB)*, *Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2 (GP2)*, *Beta-1,4-galactosyltransferase 1 (B4GALT1)*, *Apolipoprotein A-I (APOA1)*.

A *Glutathione synthetase (GSHB)* é uma proteína que catalisa a segunda etapa da biossíntese de Glutathione a partir de L- cisteína e L- glutamato e influencia a regulação redox e a defesa oxidativa das células (59). Estudos demonstraram que os níveis de GSHB estavam elevados em tecidos do câncer de cólon quando comparados com a mucosa normal e, portanto, foi relatada como possível biomarcador de câncer de cólon e alvo terapêutico de drogas contra esse tipo de câncer (60). Observou-se também, no estudo de Strohkamp *et. al.*, níveis mais elevados de *Glutathione synthetase* em plaquetas de pacientes com câncer colorretal quando comparados com doadores saudáveis. Além disso, o autor levanta a hipótese de que o valor potencial de se examinar a regulação da GSHB pode servir como um indicador de prognóstico clínico para malignidade (61). No presente estudo, os níveis dessa proteína apresentaram-se duas vezes maiores no período pré-orquiectomia. Dessa forma, podemos hipotetizar que a hiperexpressão dessa proteína pode estar associada à proliferação de células tumorais, uma vez que, a GSHB também pode apresentar um potencial pró-tumorigênico (61).

O *Monocyte differentiation antigen CD14 (CD14)* é um antígeno de superfície expresso preferencialmente em monócitos/macrófagos. Cooperar com outras proteínas para mediar a resposta imune inata. Em estudos com câncer de bexiga (62) definiu-se um papel crucial do CD14 em orquestrar inflamação promovida pelo tumor. Fatores inflamatórios produzidos por subpopulações de células tumorais com alta expressão de CD14 ativam a angiogênese para apoiar o estabelecimento e manutenção de um microambiente tumoral inflamatório. Além disso, essa subpopulação é capaz de conduzir crescimento tumoral, produzindo fatores que conduzem a um estímulo

proliferativo autócrino e parácrino. (62). No plasma seminal, estudos anteriores demonstraram que a concentração de CD14 é de aproximadamente 2-6 µg/mL, embora altos níveis dessa proteína tenham sido relatados em doenças infecciosas e inflamatórias (63). Em nosso estudo, observamos que a expressão dessa proteína estava três vezes maior no grupo pré-orquiectomia. Assim, podemos hipotetizar que o aumento na expressão dessa proteína pode estar ligado a um possível processo inflamatório no ambiente testicular. Em nosso estudo anterior (48), observamos que os níveis de peroxidação lipídica do plasma seminal de homens portadores de TCGT estavam aumentados na amostra seminal pré-orquiectomia. Além disso, foi observado um aumento na fragmentação de DNA e uma diminuição na atividade mitocondrial dos espermatozoides. Para tais resultados, hipotetizou-se que um processo inflamatório mediado pelo tumor no ambiente testicular poderia estar causando as alterações na qualidade funcional dos espermatozoides. Entretanto, estudos que relacionem a expressão dessa proteína com indicadores de inflamação, como por exemplo, interleucinas são necessários para explorar mais essa hipótese.

A *Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2* (GP2) é uma proteína de membrana integral que é secretada a partir de grânulos intracelulares de zimogênio e se associa à membrana plasmática por meio da ligação de glicosilfosfatidilinositol (GPI), e é secretada por células pancreáticas (64). Em alguns estudos (65), o GP2 apresentou-se como constituinte de células imunológicas expressando-se em células-chave da resposta imune inata e adaptiva, como células T e monócitos. Em nosso estudo, a proteína *Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2* apresentou-se quase duas vezes mais expressa no grupo pré-orquiectomia quando comparado com o grupo pós-orquiectomia. Entretanto, são escassos os relatos sobre a expressão dessa proteína em populações de células não pancreáticas (66).

A biossíntese de complexo glicanos é estritamente controlada por vários subconjuntos de enzimas específicas conhecidas como glicosiltransferase (67). Entre essas, a *Beta-1,4-galactosyltransferase 1* (B4GALT1), proteína existente em dois compartimentos celulares distintos, no complexo de Golgi e na membrana plasmática, (68) desempenha uma variedade de papéis em condições fisiológicas e patológicas, como extensão de neuritos, interação entre os espermatozoides e o oócito (69), além de metástase e proliferação de células cancerígenas (70,71). Alterações da expressão

de B4GALT foram documentadas em alguns tipos de câncer, como câncer de mama (72), câncer de cólon, câncer hepatocelular, câncer de pulmão (70), leucemia (73), neuroblastoma (74), e câncer de próstata (75). Em nosso estudo observamos que a expressão dessa proteína está 1,6 vezes maior no grupo pré-orquiectomia. Dessa forma, podemos sugerir que o aumento da sua expressão pode estar relacionado a proliferação de células germinativas cancerígenas.

A *Apolipoprotein A-I* (APOA1) é uma proteína que participa no transporte reverso de colesterol dos tecidos para o fígado para a sua excreção, promovendo assim o efluxo de colesterol dos tecidos e atuando como co-fator Lecitina Colesterol aciltransferase (LCAT). Também é uma proteína envolvida na ativação da motilidade dos espermatozoides. No estudo de Antoniassi *et al.* (76) foi observado um aumento da expressão dessa proteína no plasma seminal de homens fumantes. Outro achado em relação a essa proteínas foi no estudo de Ferigolo e colaboradores (77), que observou uma hiperexpressão da APOA1 em homens obesos. Assim, como essa proteína está associada a diferentes condições que levam a infertilidade, a hiper-expressão dela em homens portadores de TCGT pode explicar a baixa qualidade seminal observada. Portanto, um estudo de validação dessa proteína em diferentes coortes de homens inférteis pode trazer informação adicional sobre o papel dessa proteína.

Em relação ao período pós-orquiectomia, as proteínas que estavam hiperexpressas foram: *Sorbitol dehydrogenase* (DHSO), *Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4* (TGM4), *Glutathione S-transferase P* (GSTP1), *Protein/nucleic acid deglycase DJ-1* (PARK7), *Zinc-alpha-2-glycoprotein* (ZA2G), *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B* (PPIB), *Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-Y* (USP9Y), *Cathepsin D* (CATD). A *Sorbitol dehydrogenase* (DHSO) é uma enzima chave na via do polioliol. Nesta via, a glicose é reduzida ao sorbitol pela ação da aldose redutase e o sorbitol resultante é subsequentemente oxidado em frutose pela ação da sorbitol desidrogenase (78). Estudos (79) demonstraram, que altos níveis de atividade de DHSO foram encontrados nos testículos, sendo expresso principalmente nas células espermátogênicas. Tanto a frutose como o sorbitol, subprodutos dessa via, são utilizadas como fontes de energia para os espermatozoides (79). Além disso, foi observado que o aumento na expressão de DHSO pode estar associado à tumorigênese em câncer colorretal (80). Em nosso estudo, relatamos que esta proteína estava 1,2 vezes mais presente no grupo pós-orquiectomia. Esse resultado pode

corroborar com os achados de outro estudo (48) realizado por nosso grupo, onde foi observado um aumento da atividade mitocondrial após a realização da orquiectomia, fato esse que pode estar relacionado a presença dessa proteína no plasma seminal desses homens.

A proteína *Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4* (TGM4) está associada ao processo reprodutivo em mamíferos. Em camundongos TGM4 *knock-out* machos não se observou formação do tampão copulatório, apresentando-se com fertilidade reduzida, apesar de concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides normais (81). Além disso, também foi sugerido que algumas proteínas da vesícula seminal se coagulam na ausência da TGM4 (82). No estudo de Del Giudice e colaboradores (83), observou-se a presença dessa proteína exclusivamente no grupo pós-varicocelectomia. Por outro lado, estudos anteriores sobre a TGM4 revelaram-na como uma proteína chave na regulação de invasividade (84) e adesão celular (85), além de demonstrar uma associação dessa proteína com a transição epitélio-mesenquimal e interação entre o câncer e as células endoteliais vasculares (86). Além disso, Drabovich e colaboradores (87) observaram um aumento na expressão de TGM4 em homens com Câncer de Próstata em comparação com indivíduos saudáveis, apontando essa proteína como um possível biomarcador para esse tipo de câncer. No presente estudo, foi observado que a expressão da *Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4* estava 1,3 vezes em maior quantidade no grupo pós-orquiectomia.

A *Glutathione S-transferase* (GSTs) é uma proteína multifuncional expressa ubiquamente na maioria dos organismos vivos e que catalisam a conjugação da glutathione (GSH) com diferentes substratos tóxicos fornecidos com um centro eletrofílico. (88). Em resposta à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), as GSTs podem alterar os níveis celulares de GSH (89). Além disso, as proteínas pertencentes a esse grupo também estão envolvidas na regulação de diferentes processos metabólicos, sinalização e resposta ao estresse (90). Os GSTs compreendem pelo menos cinco famílias de genes representadas pelas quatro classes citosólicas: Alfa, Mu, Teta e Pi, e pelo menos uma distinta classe microsomal associada à membrana (91). No presente estudo, foi observado um aumento da expressão do GST pi/ GSTP1 no grupo pós-orquiectomia. Considerando-se que essa proteína é capaz de proteger a célula contra danos oxidativos (92), pode-se sugerir



que o aumento de sua expressão pode levar ao equilíbrio entre os níveis de EROs e antioxidantes no microambiente testicular, antes alterados pela presença do tumor. O resultado observado nesse estudo corrobora com os achados observados em um estudo anterior do nosso grupo, onde se observou uma diminuição nos níveis de peroxidação lipídica do plasma seminal após a orquiectomia (48).

A *Protein/nucleic acid deglycase DJ-1* (PARK7) é expressa ubiquamente em vários tecidos humanos, com uma alta expressão particularmente nos testículos (93). Embora sua função bioquímica ainda não seja precisamente conhecida, estudos demonstraram que a PARK7 é uma proteína multifuncional e desempenha papel essencial em tecidos com funções biológicas de ordem superior, incluindo transformação celular (93), fertilização e maturação dos espermatozoides (94–96), resposta ao estresse oxidativo (97–100) e doença de Parkinson (101). A PARK7 e suas proteínas homólogas *Sperm protein 22* (SP22) e *contraception-associated protein 1* (CAP1) foram identificadas como proteínas que se relacionam com a infertilidade masculina (94,102,103). Além disso, foi também demonstrado que a PARK 7 começa a ser expressa após o aparecimento do segundo espermátócito durante a espermatogênese e finalmente se aloca no segmento cefálico dos espermatozoides, indicando importante função dessa proteína na espermatogênese (102,103).

No estudo realizado por Sun e colaboradores (104), observou-se uma diminuição nos níveis de expressão da PARK7 no plasma seminal de homens astenozoospermicos quando comparados com doadores normais, sugerindo-se um papel da proteína na motilidade dos espermatozoides. Ademais, foi também observado um aumento nos níveis de peroxidação lipídica e diminuição do potencial de membrana (MMP) dos espermatozoides de homens astenozoospermicos, associados pelo autor a baixa expressão da PARK7 nessas amostras

Em nosso estudo, observou-se um aumento da expressão da PARK7 nas amostras pós-orquiectomia em 1,5 vezes, corroborando com os resultados observados em um estudo realizado previamente por nosso grupo (48), onde se observou um aumento na atividade mitocondrial dos espermatozoides e uma diminuição dos níveis de peroxidação lipídica do plasma seminal de homens portadores de tumor de células germinativas de testículo após 34 dias da realização da orquiectomia. Dessa forma, podemos sugerir que a PARK7 desempenhou um papel importante na melhora da

atividade mitocondrial dos espermatozoides, além de, diminuir os efeitos do estresse oxidativo no plasma seminal.

A *Zinc-alpha-2-glycoprotein* (AZGP1) é conhecida por atuar com um fator mobilizador de lipídios para estimular a lipólise em adipócitos por meio da estimulação de adenilato ciclase em um processo dependente de GTP (105,106). A AZGP1 foi descrita por participar ativamente da proliferação tumoral (107–109) e o aumento de sua expressão foi associado com alguns tipos de câncer como, o de próstata (110) e o de mama (111). Em relação à fertilidade masculina, a associação da AZGP1 foi descrita por alguns autores. Starita-Geribaldi e colaboradores em seu estudo (112), observaram a ausência da expressão de AZGP1 no plasma seminal de homens azoospermicos. Enquanto Ding e colaboradores (113), sugeriram, *que a Zinc-alpha-2-glycoprotein* pode desempenhar um papel importante nos mecanismos que modulam a motilidade espermática, demonstrando assim, a importância dessa proteína para a fertilidade. No presente estudo, foi observado que a expressão da AZGP1 estava 1,6 vezes maior no grupo pós-orquiectomia. Dessa forma, podemos hipotetizar que o aumento na sua expressão pode estar relacionado a uma melhora na espermatogênese.

A *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B* (PPIB), também chamada de *Cyclophilin B*, é uma proteína pertencente à família das ciclofilinas, enzimas altamente conservadas, importantes em múltiplos processos celulares. As ciclofilinas são responsáveis por catalisar a isomerização cis-trans de ligações peptídicas imídicas da prolina em oligopeptídeos e, portanto, pode auxiliar no dobramento de proteínas (114). Em seu estudo, Intasqui e colaboradores observaram a presença da PPIB no plasma seminal de homens com altas taxas de fragmentação de DNA. Entretanto, pouco se sabe sobre o papel dessa proteína na fertilidade masculina. Em nosso estudo, foi observado que a expressão dessa proteína estava 1,8 vezes maior no grupo pós-orquiectomia. Devido a dificuldade de se entender a associação dessa proteína com a fertilidade masculina é fundamental a realização de estudos que visam compreender o seu papel no plasma seminal.

A *Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-Y* (USP9Y) é uma proteína expressa ubiquamente em tecidos adultos e embrionários (115). O gene responsável por sua codificação se localiza na região AZFa no braço longo do cromossomo Y. A USP9Y assemelha-se a proteases específicas da ubiquitina, que clivam a fração da

ubiquitina unida a percursores e proteínas ubiquitinadas (115). Em relação à fertilidade masculina, deleções e pequenas mutações no gene USP9Y parecem estar associadas com uma hipospermatogênese severa. Uma mutação pontual do USP9Y resulta em parada parcial da espermatogênese no estágio de espermatócito, com poucas células germinativas pós-meióticas (116). Em nosso estudo, foi observado que a USP9Y estava 2,2 vezes em maior quantidade no grupo pós-orquiectomia. Com base nessa informação, podemos sugerir, mesmo após 34 dias da orquiectomia, uma melhora na espermatogênese do testículo contralateral, que poderia possivelmente estar sofrendo influência de substâncias parácrinas liberadas pelo tumor (117).

A *Cathepsin D* (CATD) é uma protease aspártica lisossomal presente em um amplo espectro de células somáticas e tecidos (118). Foi proposto que proteases participam do processo de migração celular e/ou espermatozoides durante a translocação do desenvolvimento de células germinativas através do epitélio seminífero durante a espermatogênese. O estudo realizado por Igldoura e colaboradores demonstrou que a *Cathepsin D* se localiza sobre lisossomos nas células de Sertoli e Leydig e no acrossomo de espermátides (119). Além disso, sua biossíntese e secreção no epidídimo são moduladas pelas células principais do epitélio epididimal proximal. Ao ser secretada no fluído como parte de epididimossomos, a CATD é transferida para a superfície espermática dentro da cabeça do epidídimo. A quantidade de CATD na superfície espermática diminui gradualmente até desaparecer nos espermatozoides na cauda do epidídimo. As alterações nos níveis de CATD observadas no estudo fornecem, portanto, evidências que indicam uma dinâmica na membrana espermática por meio de processos de adsorção e remoção a maturação epididimal dos espermatozoides, tornando maduro funcionalmente antes da fertilização. Em nosso estudo, observamos que a CATD está seis vezes em maior quantidade no grupo pós-orquiectomia. Dessa forma, podemos presumir que o aumento na expressão no grupo pós-orquiectomia dessa proteína, provavelmente, demonstra melhora na espermatogênese após a cirurgia.

Em resumo, com os resultados obtidos nesse estudo podemos observar uma maior expressão de proteínas no grupo pré-orquiectomia que são responsáveis por promover um processo inflamatório local mediado pelo tumor. Levando a liberação de citocinas pró-inflamatórias que podem causar um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando assim, em um desbalanço entre os níveis de

antioxidantes e as EROs, culminando em um processo conhecido como estresse oxidativo (EO). Na literatura, a associação entre o estresse oxidativo e os danos aos espermatozoides é bem estabelecido (120–123). Sabe-se que o aumento de EROs está associado ao aumento da fragmentação do DNA dos espermatozoides (124,125), a uma diminuição na atividade mitocondrial (126) e na integridade do acrossoma dos espermatozoides (127). Fato esse, que foi observado em um estudo realizado anteriormente por nosso grupo, onde homens portadores de tumor de células germinativas de testículo apresentaram um aumento na fragmentação do DNA e uma diminuição na atividade mitocondrial dos espermatozoides, além de um aumento dos níveis de peroxidação lipídica do plasma seminal antes da realização da orquiectomia.

Podemos sugerir que a orquiectomia, mesmo que em curto período de tempo (média de 34 dias) decorridos desde sua realização, foi capaz de diminuir os agentes estressores, como o processo inflamatório, provavelmente ocasionado pela liberação de substâncias produzidas pelo tumor e que afetavam de forma parácrina o testículo contralateral. Observou-se também o aumento da expressão de proteínas envolvidas no processo de espermatogênese, em mecanismos que modulam a motilidade espermática e que estão envolvidas nos processos de defesa antioxidantes. Achados esses, que também corroboram com os resultados obtidos no estudo realizado posteriormente por nosso grupo, onde se observou, após uma média de 34 dias da realização da orquiectomia, uma diminuição na fragmentação do DNA dos espermatozoides e nos níveis de peroxidação lipídica do plasma seminal, além do aumento da atividade mitocondrial dos espermatozoides.

Ademais, algumas proteínas que apresentaram maior expressão no grupo pós-orquiectomia também estão associadas com o desenvolvimento tumoral. Sabe-se que o TCGT prévio associa-se fortemente ao desenvolvimento de tumor no testículo contralateral (128,129). Dessa forma, a presença dessas proteínas pode, possivelmente, estar associada ao desenvolvimento de novas células tumorais.

Entretanto, mais estudos são necessários para proporcionar um maior entendimento em relação aos efeitos moleculares do tumor e de sua retirada, por meio da orquiectomia, no ambiente testicular.

## **6. CONCLUSÃO**

Embora a orquiectomia não tenha levado a alterações nas variáveis seminais, a retirada do testículo afetado pelo tumor levou a alterações na composição proteômica do plasma seminal. Após a orquiectomia, foi observado uma diminuição na expressão de proteínas relacionadas ao processo inflamatório e proliferação de células tumorais e um aumento na expressão de proteínas relacionadas ao processo de espermatogênese, modulação da motilidade espermática e defesa antioxidante.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Manecksha RP, Fitzpatrick JM. Epidemiology of testicular cancer. *BJU Int.* novembro de 2009;104(9 Pt B):1329–33.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 1º de novembro de 2018;68(6):394–424.
3. INCA - Câncer - Tipo - Testículo [Internet]. [citado 11 de janeiro de 2016]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/testiculo>
4. Botchan A, Hauser R, Yagev L, Gamzu R, Paz G, Lessing JB, et al. Testicular cancer and spermatogenesis. *Hum Reprod Oxf Engl.* abril de 1997;12(4):755–8.
5. Gandini L, Lombardo F, Salacone P, Paoli D, Anselmo AP, Culasso F, et al. Testicular cancer and Hodgkin's disease: evaluation of semen quality. *Hum Reprod Oxf Engl.* abril de 2003;18(4):796–801.
6. Huyghe E, Matsuda T, Thonneau P. Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J Urol.* julho de 2003;170(1):5–11.
7. Leman ES, Magheli A, Yong KMA, Netto G, Hinz S, Getzenberg RH. Identification of nuclear structural protein alterations associated with seminomas. *J Cell Biochem.* 15 de dezembro de 2009;108(6):1274–9.
8. Miguel Srougi. *Urologia: fundamentos para o clínico.* São Paulo: Sarvier; 2001. 222–223 p.
9. Holger M, Humphrey, Peter A., Ulbright Thomas M., Reuter Victor E. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.* International Agency for Research on Cancer; 2016.
10. Chung P, Warde P. Testicular cancer: seminoma. *BMJ Clin Evid.* 25 de janeiro de 2011;2011.
11. Chung P, Warde P. Stage I seminoma: adjuvant treatment is effective but is it necessary? *J Natl Cancer Inst.* 2 de fevereiro de 2011;103(3):194–6.
12. Chieffi P. An Overview on Predictive Biomarkers of Testicular Germ Cell Tumors. *J Cell Physiol.* fevereiro de 2017;232(2):276–80.
13. Akre O, Ekblom A, Hsieh CC, Trichopoulos D, Adami HO. Testicular nonseminoma and seminoma in relation to perinatal characteristics. *J Natl Cancer Inst.* 3 de julho de 1996;88(13):883–9.
14. Powles T. Stage I nonseminomatous germ cell tumor of the testis: more questions than answers? *Hematol Oncol Clin North Am.* junho de 2011;25(3):517–527,viii.
15. Meirow D, Schenker JG. Cancer and male infertility. *Hum Reprod Oxf Engl.* agosto de 1995;10(8):2017–22.
16. Agarwal A, Allamaneni SSR. Disruption of spermatogenesis by the cancer disease process. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2005;(34):9–12.

17. Petersen PM, Skakkebaek NE, Giwercman A. Gonadal function in men with testicular cancer: biological and clinical aspects. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* janeiro de 1998;106(1):24–34; discussion 34–36.
18. Howell SJ, Shalet SM. Testicular function following chemotherapy. *Hum Reprod Update.* agosto de 2001;7(4):363–9.
19. Fraietta R, Spaine DM, Bertolla RP, Ortiz V, Cedenho AP. Individual and seminal characteristics of patients with testicular germ cell tumors. *Fertil Steril.* novembro de 2010;94(6):2107–12.
20. Petersen PM, Giwercman A, Skakkebaek NE, Rørth M. Gonadal function in men with testicular cancer. *Semin Oncol.* abril de 1998;25(2):224–33.
21. Looijenga LH, de Munnik H, Oosterhuis JW. A molecular model for the development of germ cell cancer. *Int J Cancer.* 10 de dezembro de 1999;83(6):809–14.
22. Skakkebaek NE. Possible carcinoma-in-situ of the testis. *Lancet Lond Engl.* 9 de setembro de 1972;2(7776):516–7.
23. Looijenga LHJ, Zafarana G, Grygalewicz B, Summersgill B, Debiec-Rychter M, Veltman J, et al. Role of gain of 12p in germ cell tumour development. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* janeiro de 2003;111(1):161–71; discussion 172–173.
24. Baroni T, Arato I, Mancuso F, Calafiore R, Luca G. On the Origin of Testicular Germ Cell Tumors: From Gonocytes to Testicular Cancer. *Front Endocrinol.* 2019;10:343.
25. Strohmeyer T, Peter S, Hartmann M, Munemitsu S, Ackermann R, Ullrich A, et al. Expression of the hst-1 and c-kit protooncogenes in human testicular germ cell tumors. *Cancer Res.* 1º de abril de 1991;51(7):1811–6.
26. Chieffi P, Franco R, Portella G. Molecular and cell biology of testicular germ cell tumors. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2009;278:277–308.
27. Honecker F, Stoop H, de Krijger RR, Chris Lau Y-F, Bokemeyer C, Looijenga LHJ. Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *J Pathol.* julho de 2004;203(3):849–57.
28. Giwercman A, Skakkebaek NE. Carcinoma in situ of the testis: biology, screening and management. *Eur Urol.* 1993;23 Suppl 2:19–21.
29. Rajpert-De Meyts E, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Almstrup K. Diagnostic markers for germ cell neoplasms: from placental-like alkaline phosphatase to micro-RNAs. *Folia Histochem Cytobiol.* 2015;53(3):177–88.
30. Alagaratnam S, Lind GE, Kraggerud SM, Lothe RA, Skotheim RI. The testicular germ cell tumour transcriptome. *Int J Androl.* agosto de 2011;34(4 Pt 2):e133–150; discussion e150–151.
31. Gashaw I, Dushaj O, Behr R, Biermann K, Brehm R, Rübber H, et al. Novel germ cell markers characterize testicular seminoma and fetal testis. *Mol Hum Reprod.* outubro de 2007;13(10):721–7.
32. Kraggerud SM, Hoei-Hansen CE, Alagaratnam S, Skotheim RI, Abeler VM, Rajpert-De Meyts E, et al. Molecular characteristics of malignant ovarian germ cell tumors and comparison with

- testicular counterparts: implications for pathogenesis. *Endocr Rev.* junho de 2013;34(3):339–76.
33. Rajpert-De Meyts E, McGlynn KA, Okamoto K, Jewett MAS, Bokemeyer C. Testicular germ cell tumours. *Lancet Lond Engl.* 23 de abril de 2016;387(10029):1762–74.
  34. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod Oxf Engl.* maio de 2001;16(5):972–8.
  35. Boisen KA, Main KM, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Are male reproductive disorders a common entity? The testicular dysgenesis syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* dezembro de 2001;948:90–9.
  36. Forman D, Oliver RT, Brett AR, Marsh SG, Moses JH, Bodmer JG, et al. Familial testicular cancer: a report of the UK family register, estimation of risk and an HLA class 1 sib-pair analysis. *Br J Cancer.* fevereiro de 1992;65(2):255–62.
  37. Krausz C, Looijenga LHJ. Genetic aspects of testicular germ cell tumors. *Cell Cycle Georget Tex.* 15 de novembro de 2008;7(22):3519–24.
  38. Lutke Holzik MF, Rapley EA, Hoekstra HJ, Sleijfer DT, Nolte IM, Sijmons RH. Genetic predisposition to testicular germ-cell tumours. *Lancet Oncol.* junho de 2004;5(6):363–71.
  39. Garner M, Turner MC, Ghadirian P, Krewski D, Wade M. Testicular cancer and hormonally active agents. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* março de 2008;11(3–4):260–75.
  40. Batool A, Karimi N, Wu X-N, Chen S-R, Liu Y-X. Testicular germ cell tumor: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci CMLS.* maio de 2019;76(9):1713–27.
  41. Goldberg H, Klaassen Z, Chandrasekar T, Fleshner N, Hamilton RJ, Jewett MAS. Germ Cell Testicular Tumors-Contemporary Diagnosis, Staging and Management of Localized and Advanced disease. *Urology.* 2019;125:8–19.
  42. Stevenson SM, Lowrance WT. Epidemiology and Diagnosis of Testis Cancer. *Urol Clin North Am.* agosto de 2015;42(3):269–75.
  43. Salem M, Gilligan T. Serum tumor markers and their utilization in the management of germ-cell tumors in adult males. *Expert Rev Anticancer Ther.* janeiro de 2011;11(1):1–4.
  44. Trigo JM, Tabernero JM, Paz-Ares L, García-Llano JL, Mora J, Lianes P, et al. Tumor markers at the time of recurrence in patients with germ cell tumors. *Cancer.* 1º de janeiro de 2000;88(1):162–8.
  45. Kaufman MR, Chang SS. Short- and long-term complications of therapy for testicular cancer. *Urol Clin North Am.* maio de 2007;34(2):259–68; abstract xi.
  46. Liguori G, Trombetta C, Bucci S, Benvenuto S, Amodeo A, Ocello G, et al. Semen quality before and after orchiectomy in men with testicular cancer. *Arch Ital Urol Androl Organo Uff Soc Ital Ecogr Urol E Nefrol Assoc Ric Urol.* setembro de 2008;80(3):99–102.



47. Petersen PM, Skakkebaek NE, Rørth M, Giwercman A. Semen quality and reproductive hormones before and after orchiectomy in men with testicular cancer. *J Urol.* março de 1999;161(3):822–6.
48. Andrade MBR, Bertolla RP, Intasqui P, Antoniassi MP, Tibaldi DS, Belardin LB, et al. Effect of orchiectomy on sperm functional aspects and semen oxidative stress in men with testicular tumours. *Andrologia.* abril de 2019;51(3):e13205.
49. Wang J, Wang J, Zhang H-R, Shi H-J, Ma D, Zhao H-X, et al. Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality. *Asian J Androl.* julho de 2009;11(4):484–91.
50. Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol.* 2006;7(5):R40.
51. Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Messina I, Pontecorvi A, De Marinis L, et al. Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertil Steril.* janeiro de 2012;97(1):67-73.e1.
52. Intasqui P, Camargo M, Del Giudice PT, Spaine DM, Carvalho VM, Cardozo KHM, et al. Sperm nuclear DNA fragmentation rate is associated with differential protein expression and enriched functions in human seminal plasma. *BJU Int.* outubro de 2013;112(6):835–43.
53. Batruch I, Lecker I, Kagedan D, Smith CR, Mullen BJ, Grober E, et al. Proteomic analysis of seminal plasma from normal volunteers and post-vasectomy patients identifies over 2000 proteins and candidate biomarkers of the urogenital system. *J Proteome Res.* 4 de março de 2011;10(3):941–53.
54. World Health Organization, organizador. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010. 271 p.
55. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* dezembro de 1986;46(6):1118–23.
56. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* outubro de 1985;150(1):76–85.
57. Camargo M, Intasqui P, Belardin LB, Antoniassi MP, Cardozo KHM, Carvalho VM, et al. Molecular pathways of varicocele and its repair - A paired labelled shotgun proteomics approach. *J Proteomics.* 30 de março de 2019;196:22–32.
58. Donato P, Cacciola F, Mondello L, Dugo P. Comprehensive chromatographic separations in proteomics. *J Chromatogr A.* 9 de dezembro de 2011;1218(49):8777–90.
59. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* maio de 2013;1830(5):3143–53.
60. Kim AD, Zhang R, Han X, Kang KA, Piao MJ, Maeng YH, et al. Involvement of glutathione and glutathione metabolizing enzymes in human colorectal cancer cell lines and tissues. *Mol Med Rep.* setembro de 2015;12(3):4314–9.

61. Strohkamp S, Gemoll T, Humborg S, Hartwig S, Lehr S, Freitag-Wolf S, et al. Protein levels of clusterin and glutathione synthetase in platelets allow for early detection of colorectal cancer. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2018;75(2):323–34.
62. Cheah MT, Chen JY, Sahoo D, Contreras-Trujillo H, Volkmer AK, Scheeren FA, et al. CD14-expressing cancer cells establish the inflammatory and proliferative tumor microenvironment in bladder cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14 de abril de 2015;112(15):4725–30.
63. Harris CL, Vigar MA, Rey Norez JE, Horejsi V, Labeta MO, Morgan BP. The lipopolysaccharide co-receptor CD14 is present and functional in seminal plasma and expressed on spermatozoa. *Immunology*. novembro de 2001;104(3):317–23.
64. Colomer V, Lal K, Hoops TC, Rindler MJ. Exocrine granule specific packaging signals are present in the polypeptide moiety of the pancreatic granule membrane protein GP2 and in amylase: implications for protein targeting to secretory granules. *EMBO J*. 15 de agosto de 1994;13(16):3711–9.
65. Werner L, Paclik D, Fritz C, Reinhold D, Roggenbuck D, Sturm A. Identification of pancreatic glycoprotein 2 as an endogenous immunomodulator of innate and adaptive immune responses. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 de setembro de 2012;189(6):2774–83.
66. Fukuoka S, Freedman SD, Yu H, Sukhatme VP, Scheele GA. GP-2/THP gene family encodes self-binding glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in apical secretory compartments of pancreas and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 de fevereiro de 1992;89(4):1189–93.
67. Gagneux P, Varki A. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology*. agosto de 1999;9(8):747–55.
68. Youakim A, Dubois DH, Shur BD. Localization of the long form of beta-1,4-galactosyltransferase to the plasma membrane and Golgi complex of 3T3 and F9 cells by immunofluorescence confocal microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 de novembro de 1994;91(23):10913–7.
69. Akintayo A, Stanley P. Roles for Golgi Glycans in Oogenesis and Spermatogenesis. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 7 de junho de 2019 [citado 30 de setembro de 2019];7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6566014/>
70. Zhu X, Jiang J, Shen H, Wang H, Zong H, Li Z, et al. Elevated beta1,4-galactosyltransferase I in highly metastatic human lung cancer cells. Identification of E1AF as important transcription activator. *J Biol Chem*. 1º de abril de 2005;280(13):12503–16.
71. Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer*. setembro de 2015;15(9):540–55.
72. Choi H-J, Chung T-W, Kim C-H, Jeong H-S, Joo M, Youn B, et al. Estrogen induced  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase 1 expression regulates proliferation of human breast cancer MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 5 de outubro de 2012;426(4):620–5.
73. Zhou H, Zhang Z, Liu C, Jin C, Zhang J, Miao X, et al. B4GALT1 gene knockdown inhibits the hedgehog pathway and reverses multidrug resistance in the human leukemia K562/adriamycin-resistant cell line. *IUBMB Life*. novembro de 2012;64(11):889–900.
74. Chang H-H, Chen C-H, Chou C-H, Liao Y-F, Huang M-J, Chen Y-H, et al.  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase III enhances invasive phenotypes via  $\beta$ 1-integrin and predicts poor

- prognosis in neuroblastoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1º de abril de 2013;19(7):1705–16.
75. Radhakrishnan P, Chachadi V, Lin M-F, Singh R, Kannagi R, Cheng P-W. TNF $\alpha$  enhances the motility and invasiveness of prostatic cancer cells by stimulating the expression of selective glycosyl- and sulfotransferase genes involved in the synthesis of selectin ligands. *Biochem Biophys Res Commun*. 10 de junho de 2011;409(3):436–41.
  76. Antoniassi MP, Intasqui P, Camargo M, Zylbersztejn DS, Carvalho VM, Cardozo KHM, et al. Analysis of the functional aspects and seminal plasma proteomic profile of sperm from smokers. *BJU Int*. novembro de 2016;118(5):814–22.
  77. Ferigolo PC, Ribeiro de Andrade MB, Camargo M, Carvalho VM, Cardozo KHM, Bertolla RP, et al. Sperm functional aspects and enriched proteomic pathways of seminal plasma of adult men with obesity. *Andrology*. maio de 2019;7(3):341–9.
  78. King TE, Mann T. Sorbitol dehydrogenase in spermatozoa. *Nature*. 27 de setembro de 1958;182(4639):868–9.
  79. Kobayashi T, Kaneko T, Iuchi Y, Matsuki S, Takahashi M, Nakada T, et al. Localization and Physiological Implication of Aldose Reductase and Sorbitol Dehydrogenase in Reproductive Tracts and Spermatozoa of Male Rats. *J Androl*. 10 de setembro de 2002;23(5):674–84.
  80. Uzozie A, Nanni P, Staiano T, Grossmann J, Barkow-Oesterreicher S, Shay JW, et al. Sorbitol Dehydrogenase Overexpression and Other Aspects of Dysregulated Protein Expression in Human Precancerous Colorectal Neoplasms: A Quantitative Proteomics Study. *Mol Cell Proteomics MCP*. maio de 2014;13(5):1198–218.
  81. Dean MD. Genetic disruption of the copulatory plug in mice leads to severely reduced fertility. *PLoS Genet*. 2013;9(1):e1003185.
  82. Tseng H-C, Tang J-B, Gandhi PSS, Luo C-W, Ou C-M, Tseng C-J, et al. Mutual adaptation between mouse transglutaminase 4 and its native substrates in the formation of copulatory plug. *Amino Acids*. fevereiro de 2012;42(2–3):951–60.
  83. Del Giudice PT, da Silva BF, Lo Turco EG, Fraietta R, Spaine DM, Santos LFA, et al. Changes in the seminal plasma proteome of adolescents before and after varicocelectomy. *Fertil Steril*. setembro de 2013;100(3):667–72.
  84. Davies G, Ablin RJ, Mason MD, Jiang WG. Expression of the prostate transglutaminase (TGase-4) in prostate cancer cells and its impact on the invasiveness of prostate cancer. *J Exp Ther Oncol*. 2007;6(3):257–64.
  85. Jiang WG, Ye L, Sanders AJ, Ruge F, Kynaston HG, Ablin RJ, et al. Prostate transglutaminase (TGase-4, TGaseP) enhances the adhesion of prostate cancer cells to extracellular matrix, the potential role of TGase-core domain. *J Transl Med*. 25 de outubro de 2013;11:269.
  86. Jiang WG, Ablin RJ, Kynaston HG, Mason MD. The prostate transglutaminase (TGase-4, TGaseP) regulates the interaction of prostate cancer and vascular endothelial cells, a potential role for the ROCK pathway. *Microvasc Res*. março de 2009;77(2):150–7.
  87. Drabovich AP, Saraon P, Drabovich M, Karakosta TD, Dimitromanolakis A, Hyndman ME, et al. Multi-omics Biomarker Pipeline Reveals Elevated Levels of Protein-glutamine Gamma-

- glutamyltransferase 4 in Seminal Plasma of Prostate Cancer Patients. *Mol Cell Proteomics*. setembro de 2019;18(9):1807–23.
88. Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. março de 2004;134(3):489–92.
  89. Mannervik B, Board PG, Hayes JD, Listowsky I, Pearson WR. Nomenclature for Mammalian Soluble Glutathione Transferases. In: Sies H, Packer L, organizadores. *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 2005 [citado 9 de setembro de 2019]. p. 1–8. (Glutathione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases; vol. 401). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687905010013>
  90. Kunieda T, Fujiwara T, Amano T, Shioi Y. Molecular Cloning and Characterization of a Senescence-induced Tau-class Glutathione S-transferase from Barley Leaves. *Plant Cell Physiol*. 1º de setembro de 2005;46(9):1540–8.
  91. Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, Jensson H, Tahir MK, Warholm M, et al. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. novembro de 1985;82(21):7202–6.
  92. Fafula RV, Paranyak NM, Besedina AS, Vorobets DZ, Iefremova UP, Onufrovych OK, et al. Biological Significance of Glutathione S-Transferases in Human Sperm Cells. *J Hum Reprod Sci*. 2019;12(1):24–8.
  93. Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM, et al. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun*. 13 de fevereiro de 1997;231(2):509–13.
  94. Klinefelter GR, Laskey JW, Ferrell J, Suarez JD, Roberts NL. Discriminant analysis indicates a single sperm protein (SP22) is predictive of fertility following exposure to epididymal toxicants. *J Androl*. abril de 1997;18(2):139–50.
  95. Ooe H, Taira T, Iguchi-Ariga SMM, Ariga H. Induction of reactive oxygen species by bisphenol A and abrogation of bisphenol A-induced cell injury by DJ-1. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. novembro de 2005;88(1):114–26.
  96. Hao L-Y, Giasson BI, Bonini NM. DJ-1 is critical for mitochondrial function and rescues PINK1 loss of function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 de maio de 2010;107(21):9747–52.
  97. Mitumoto A, Nakagawa Y. DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic Res*. dezembro de 2001;35(6):885–93.
  98. Mitumoto A, Nakagawa Y, Takeuchi A, Okawa K, Iwamatsu A, Takanezawa Y. Oxidized forms of peroxiredoxins and DJ-1 on two-dimensional gels increased in response to sublethal levels of paraquat. *Free Radic Res*. setembro de 2001;35(3):301–10.
  99. Kinumi T, Kimata J, Taira T, Ariga H, Niki E. Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide-mediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 7 de maio de 2004;317(3):722–8.
  100. Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Ariga SMM, Takahashi K, Ariga H. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep*. fevereiro de 2004;5(2):213–8.

101. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*. 10 de janeiro de 2003;299(5604):256–9.
102. Wagenfeld A, Yeung CH, Strupat K, Cooper TG. Shedding of a rat epididymal sperm protein associated with infertility induced by ornidazole and alpha-chlorohydrin. *Biol Reprod*. maio de 1998;58(5):1257–65.
103. Welch JE, Barbee RR, Roberts NL, Suarez JD, Klinefelter GR. SP22: a novel fertility protein from a highly conserved gene family. *J Androl*. agosto de 1998;19(4):385–93.
104. Sun Y, Zhang W-J, Zhao X, Yuan R-P, Jiang H, Pu X-P. PARK7 protein translocating into spermatozoa mitochondria in Chinese asthenozoospermia. *REPRODUCTION*. setembro de 2014;148(3):249–57.
105. Bao Y, Bing C, Hunter L, Jenkins JR, Wabitsch M, Trayhurn P. Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed and secreted by human (SGBS) adipocytes. *FEBS Lett*. 3 de janeiro de 2005;579(1):41–7.
106. McDermott LC, Freel JA, West AP, Bjorkman PJ, Kennedy MW. Zn-alpha2-glycoprotein, an MHC class I-related glycoprotein regulator of adipose tissues: modification or abrogation of ligand binding by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*. 21 de fevereiro de 2006;45(7):2035–41.
107. Gangadharan B, Antrobus R, Dwek RA, Zitzmann N. Novel serum biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients. *Clin Chem*. outubro de 2007;53(10):1792–9.
108. Varghese SA, Powell TB, Budisavljevic MN, Oates JC, Raymond JR, Almeida JS, et al. Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease. *J Am Soc Nephrol JASN*. março de 2007;18(3):913–22.
109. Irmak S, Tilki D, Heukeshoven J, Oliveira-Ferrer L, Friedrich M, Huland H, et al. Stage-dependent increase of orosomucoid and zinc-alpha2-glycoprotein in urinary bladder cancer. *Proteomics*. novembro de 2005;5(16):4296–304.
110. Henshall SM, Horvath LG, Quinn DI, Eggleton SA, Grygiel JJ, Stricker PD, et al. Zinc-alpha2-glycoprotein expression as a predictor of metastatic prostate cancer following radical prostatectomy. *J Natl Cancer Inst*. 4 de outubro de 2006;98(19):1420–4.
111. Sánchez LM, Vizoso F, Díez-Itza I, López-Otín C. Identification of the major protein components in breast secretions from women with benign and malignant breast diseases. *Cancer Res*. 1º de janeiro de 1992;52(1):95–100.
112. Starita-Geribaldi M, Roux F, Garin J, Chevallier D, Fénichel P, Pointis G. Development of narrow immobilized pH gradients covering one pH unit for human seminal plasma proteomic analysis. *PROTEOMICS*. agosto de 2003;3(8):1611–9.
113. Ding Z, Qu F, Guo W, Ying X, Wu M, Zhang Y. Identification of sperm forward motility-related proteins in human seminal plasma. *Mol Reprod Dev*. setembro de 2007;74(9):1124–31.
114. Davis TL, Walker JR, Campagna-Slater V, Finerty PJ, Paramanathan R, Bernstein G, et al. Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. *PLoS Biol*. 27 de julho de 2010;8(7):e1000439.

115. Brown GM, Furlong RA, Sargent CA, Erickson RP, Longepied G, Mitchell M, et al. Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrb interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Hum Mol Genet.* janeiro de 1998;7(1):97–107.
116. Sun C, Skaletsky H, Birren B, Devon K, Tang Z, Silber S, et al. An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nat Genet.* dezembro de 1999;23(4):429–32.
117. Ostrowski KA, Walsh TJ. Infertility with Testicular Cancer. *Urol Clin North Am.* agosto de 2015;42(3):409–20.
118. Masson O, Bach A-S, Derocq D, Prébois C, Laurent-Matha V, Patingre S, et al. Pathophysiological functions of cathepsin D: Targeting its catalytic activity versus its protein binding activity? *Biochimie.* novembro de 2010;92(11):1635–43.
119. Igldoura SA, Morales CR, Hermo L. Differential expression of cathepsins B and D in testis and epididymis of adult rats. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* maio de 1995;43(5):545–57.
120. Alahmar AT. Role of Oxidative Stress in Male Infertility: An Updated Review. *J Hum Reprod Sci.* 2019;12(1):4–18.
121. Aitken RJ. Oxidative stress and the etiology of male infertility. *J Assist Reprod Genet.* dezembro de 2016;33(12):1691–2.
122. Huang C, Cao X, Pang D, Li C, Luo Q, Zou Y, et al. Is male infertility associated with increased oxidative stress in seminal plasma? A-meta analysis. *Oncotarget.* 11 de maio de 2018;9(36):24494–513.
123. Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol.* agosto de 2017;14(8):470–85.
124. Drevet JR, Aitken RJ. Oxidative Damage to Sperm DNA: Attack and Defense. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1166:107–17.
125. Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Baldi E. Sperm DNA Fragmentation: Mechanisms of Origin. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1166:75–85.
126. Nowicka-Bauer K, Lepczynski A, Ozgo M, Kamieniczna M, Fraczek M, Stanski L, et al. Sperm mitochondrial dysfunction and oxidative stress as possible reasons for isolated asthenozoospermia. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc.* junho de 2018;69(3).
127. Blumer CG, Restelli AE, Giudice PTD, Soler TB, Fraietta R, Nichi M, et al. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. *BJU Int.* 1º de janeiro de 2012;109(2):259–65.
128. Karellas ME, Damjanov I, Holzbeierlein JM. ITGCN of the testis, contralateral testicular biopsy and bilateral testicular cancer. *Urol Clin North Am.* maio de 2007;34(2):119–25; abstract vii.
129. Sharma P, Dhillon J, Sexton WJ. Intratubular Germ Cell Neoplasia of the Testis, Bilateral Testicular Cancer, and Aberrant Histologies. *Urol Clin North Am.* agosto de 2015;42(3):277–85.



## ANEXOS

**Anexo 1- Tabela suplementar 1.** Todas as proteínas quantificadas no plasma seminal de homens portadores de tumor de células germinativas de testículo, antes e após a realização da orquiectomia. Médias maiores que 1 indicam hiper-expressão no grupo pós-orquiectomia, enquanto que valores da média menores que 1 indicam hiper-expressão no grupo pré-orquiectomia. Análise estatística: teste T de *Student* para amostra única.

Uniprot ID	Proteína	Média	p
P48637	<i>Glutathione synthetase</i>	0,49	0,003
P02647	<i>Apolipoprotein A-I</i>	0,65	0,004
P55259	<i>Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2</i>	0,54	0,008
P15291	<i>Beta-1,4-galactosyltransferase 1</i>	0,60	0,009
P08571	<i>Monocyte differentiation antigen CD14</i>	0,38	0,012
P07339	<i>Cathepsin D</i>	6,39	0,014
P09211	<i>Glutathione S-transferase P</i>	1,45	0,019
O00507	<i>Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-Y</i>	2,21	0,037
P25311	<i>Zinc-alpha-2-glycoprotein</i>	1,63	0,040
Q00796	<i>Sorbitol dehydrogenase</i>	1,25	0,044
P23284	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B</i>	1,82	0,044
Q99497	<i>Protein/nucleic acid deglycase DJ-1</i>	1,56	0,045
P49221	<i>Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4</i>	1,36	0,046
P14625	<i>Endoplasmin</i>	1,31	0,053
Q6YHK3	<i>CD109 antigen</i>	0,69	0,057
P11021	<i>Endoplasmic reticulum chaperone BiP</i>	1,74	0,060
P20142	<i>Gastricsin</i>	1,47	0,065
Q02383	<i>Semenogelin-2</i>	1,53	0,066
O75503	<i>Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5</i>	1,10	0,068
Q709C8	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 13C</i>	0,45	0,070
P10586	<i>Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F</i>	0,56	0,073
P53396	<i>ATP-citrate synthase</i>	0,37	0,078
Q13510	<i>Acid ceramidase</i>	1,28	0,087
Q9NQ79	<i>Cartilage acidic protein 1</i>	1,40	0,095
Q58EX2	<i>Protein sidekick-2</i>	0,36	0,095
P12277	<i>Creatine kinase B-type</i>	1,50	0,098
P80303	<i>Nucleobindin-2</i>	1,51	0,100
P04279	<i>Semenogelin-1</i>	2,06	0,103
P07602	<i>Prosaposin</i>	5,13	0,113
O00754	<i>Lysosomal alpha-mannosidase</i>	0,59	0,118
Q14697	<i>Neutral alpha-glucosidase AB</i>	1,47	0,123
Q66K79	<i>Carboxypeptidase Z</i>	1,74	0,125
P01009	<i>Alpha-1-antitrypsin</i>	5,37	0,127
P01033	<i>Metalloproteinase inhibitor 1</i>	1,69	0,127
P39060	<i>Collagen alpha-1(XVIII) chain</i>	0,75	0,129
P01036	<i>Cystatin-S</i>	1,85	0,132
Q9UBR2	<i>Cathepsin Z</i>	2,26	0,133
P27487	<i>Dipeptidyl peptidase 4</i>	1,96	0,149

Continua...



...continuação tabela suplementar.

<b>P54107</b>	<i>Cysteine-rich secretory protein 1</i>	0,77	0,141
<b>P07711</b>	<i>Cathepsin L1</i>	3,49	0,145
<b>Q96KP4</b>	<i>Cytosolic non-specific dipeptidase</i>	1,67	0,146
<b>Q01459</b>	<i>Di-N-acetylchitobiase</i>	0,65	0,147
<b>Q6W4X9</b>	<i>Mucin-6</i>	1,44	0,149
<b>P02751</b>	<i>Fibronectin</i>	1,42	0,159
<b>P0DMV9</b>	<i>Heat shock 70 kDa protein 1B</i>	1,59	0,165
<b>P00558</b>	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	1,33	0,172
<b>P0DOX7</b>	<i>Immunoglobulin kappa light chain</i>	0,52	0,172
<b>P62987</b>	<i>Ubiquitin-60S ribosomal protein L40</i>	2,34	0,176
<b>Q92626</b>	<i>Peroxidasin homolog</i>	0,76	0,184
<b>Q9Y5X9</b>	<i>Endothelial lipase</i>	1,72	0,190
<b>O00560</b>	<i>Syntenin-1</i>	0,84	0,191
<b>Q6NT32</b>	<i>Carboxylesterase 5A</i>	4,13	0,193
<b>P63261</b>	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	1,27	0,197
<b>Q96DA0</b>	<i>Zymogen granule protein 16 homolog B</i>	1,45	0,200
<b>P01833</b>	<i>Polymeric immunoglobulin receptor</i>	2,15	0,202
<b>O43505</b>	<i>Beta-1,4-glucuronyltransferase 1</i>	0,64	0,203
<b>Q13162</b>	<i>Peroxiredoxin-4</i>	1,34	0,204
<b>Q15084</b>	<i>Protein disulfide-isomerase A6</i>	1,32	0,214
<b>P10253</b>	<i>Lysosomal alpha-glucosidase</i>	0,83	0,218
<b>O00339</b>	<i>Matrilin-2</i>	1,69	0,218
<b>P17405</b>	<i>Sphingomyelin phosphodiesterase</i>	1,27	0,220
<b>O43707</b>	<i>Alpha-actinin-4</i>	0,51	0,222
<b>P09466</b>	<i>Glycodelin</i>	1,73	0,228
<b>P06727</b>	<i>Apolipoprotein A-IV</i>	0,49	0,235
<b>P01034</b>	<i>Cystatin-C</i>	1,25	0,238
<b>Q13217</b>	<i>DnaJ homolog subfamily C member 3</i>	2,55	0,239
<b>P06733</b>	<i>Alpha-enolase</i>	1,64	0,241
<b>P42785</b>	<i>Lysosomal Pro-X carboxypeptidase</i>	0,65	0,242
<b>O94985</b>	<i>Calsyntenin-1</i>	0,86	0,253
<b>Q02818</b>	<i>Nucleobindin-1</i>	1,23	0,268
<b>Q06828</b>	<i>Fibromodulin</i>	1,35	0,260
<b>P01024</b>	<i>Complement C3</i>	1,31	0,264
<b>O14773</b>	<i>Tripeptidyl-peptidase 1</i>	1,24	0,269
<b>Q9BWS9</b>	<i>Chitinase domain-containing protein 1</i>	1,08	0,269
<b>Q92896</b>	<i>Golgi apparatus protein 1</i>	1,43	0,279
<b>P02790</b>	<i>Hemopexin</i>	1,66	0,284
<b>Q03167</b>	<i>Transforming growth factor beta receptor type 3</i>	1,10	0,288
<b>Q92859</b>	<i>Neogenin</i>	0,66	0,290
<b>P07900</b>	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	1,55	0,297
<b>O00391</b>	<i>Sulfhydryl oxidase 1</i>	1,18	0,299
<b>Q9HAT2</b>	<i>Sialate O-acetyltransferase</i>	0,44	0,301
<b>P15289</b>	<i>Arylsulfatase A</i>	1,22	0,313
<b>P17931</b>	<i>Galectin-3</i>	0,68	0,314
<b>P50995</b>	<i>Annexin A11</i>	2,10	0,316
<b>P0C0L5</b>	<i>Complement C4-B</i>	0,82	0,318
<b>O15230</b>	<i>Laminin subunit alpha-5</i>	1,18	0,318
<b>P09467</b>	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase 1</i>	1,33	0,325
<b>Q8IZJ3</b>	<i>C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-</i>	1,18	0,326

Continua...

...continuação tabela complementar.

	<i>containing protein 8</i>		
<b>Q6ZMQ8</b>	<i>Serine/threonine-protein kinase LMTK1</i>	1,18	0,334
<b>P09668</b>	<i>Pro-cathepsin H</i>	1,26	0,336
<b>Q04760</b>	<i>Lactoylglutathione lyase</i>	1,22	0,338
<b>Q9NR99</b>	<i>Matrix-remodeling-associated protein 5</i>	1,45	0,340
<b>Q53H76</b>	<i>Phospholipase A1 member A</i>	0,77	0,346
<b>P04083</b>	<i>Annexin A1</i>	1,15	0,352
<b>P08195</b>	<i>4F2 cell-surface antigen heavy chain</i>	0,95	0,358
<b>P10909</b>	<i>Clusterin</i>	1,20	0,367
<b>P50895</b>	<i>Basal cell adhesion molecule</i>	1,46	0,376
<b>P12821</b>	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>	1,44	0,377
<b>P30041</b>	<i>Peroxiredoxin-6</i>	1,20	0,382
<b>O00115</b>	<i>Deoxyribonuclease-2-alpha</i>	0,85	0,382
<b>Q8WVQ1</b>	<i>Soluble calcium-activated nucleotidase 1</i>	1,11	0,385
<b>P11142</b>	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	1,80	0,387
<b>P58499</b>	<i>Protein FAM3B</i>	1,24	0,390
<b>Q969X1</b>	<i>Protein lifeguard 3</i>	0,52	0,393
<b>Q9GZX9</b>	<i>Twisted gastrulation protein homolog 1</i>	1,25	0,395
<b>O43451</b>	<i>Maltase-glucoamylase, intestinal</i>	1,36	0,396
<b>Q6UXD5</b>	<i>Seizure 6-like protein 2</i>	1,15	0,411
<b>Q86X29</b>	<i>Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor</i>	1,77	0,411
<b>Q13332</b>	<i>Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S</i>	1,40	0,415
<b>Q9Y653</b>	<i>Adhesion G-protein coupled receptor G1</i>	1,57	0,421
<b>Q9Y6R7</b>	<i>IgGFC-binding protein</i>	1,13	0,430
<b>P05164</b>	<i>Myeloperoxidase</i>	1,92	0,437
<b>Q7Z4W1</b>	<i>L-xylulose reductase</i>	1,46	0,443
<b>P05067</b>	<i>Amyloid-beta A4 protein</i>	1,27	0,446
<b>Q9UK41</b>	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog</i>	0,89	0,450
<b>O14786</b>	<i>Neuropilin-1</i>	1,15	0,450
<b>P30101</b>	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	1,28	0,451
<b>P02788</b>	<i>Lactotransferrin</i>	1,15	0,456
<b>P16278</b>	<i>Beta-galactosidase</i>	0,86	0,456
<b>P08294</b>	<i>Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>	1,16	0,459
<b>P08473</b>	<i>Neprilysin</i>	0,92	0,462
<b>P04075</b>	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	1,11	0,462
<b>P02787</b>	<i>Serotransferrin</i>	1,23	0,463
<b>P55268</b>	<i>Laminin subunit beta-2</i>	1,11	0,464
<b>P02763</b>	<i>Alpha-1-acid glycoprotein 1</i>	0,68	0,469
<b>P11047</b>	<i>Laminin subunit gamma-1</i>	1,15	0,470
<b>P40925</b>	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>	1,20	0,473
<b>P01876</b>	<i>Immunoglobulin heavy constant alpha 1</i>	1,35	0,470
<b>P06858</b>	<i>Lipoprotein lipase</i>	1,14	0,480
<b>P05154</b>	<i>Plasma serine protease inhibitor</i>	1,27	0,483
<b>P08238</b>	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	0,87	0,487
<b>P61769</b>	<i>Beta-2-microglobulin</i>	11,45	0,494
<b>P02750</b>	<i>Leucine-rich alpha-2-glycoprotein</i>	1,15	0,500
<b>Q99816</b>	<i>Tumor susceptibility gene 101 protein</i>	1,13	0,501
<b>P61916</b>	<i>NPC intracellular cholesterol transporter 2</i>	6,94	0,505
<b>P63104</b>	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>	1,15	0,514
<b>P00450</b>	<i>Ceruloplasmin</i>	1,19	0,515

Continua...

...continuação tabela complementar.

<b>P35579</b>	<i>Myosin-9</i>	1,74	0,518
<b>P07288</b>	<i>Prostate-specific antigen</i>	0,90	0,519
<b>Q99985</b>	<i>Semaphorin-3C</i>	1,58	0,520
<b>P08758</b>	<i>Annexin A5</i>	0,92	0,523
<b>P0DOX5</b>	<i>Immunoglobulin gamma-1 heavy chain</i>	1,34	0,528
<b>Q08380</b>	<i>Galectin-3-binding protein</i>	1,11	0,535
<b>P12109</b>	<i>Collagen alpha-1(VI) chain</i>	0,80	0,559
<b>P12429</b>	<i>Annexin A3</i>	1,11	0,563
<b>Q8NBJ4</b>	<i>Golgi membrane protein 1</i>	2,05	0,565
<b>Q8N6Q3</b>	<i>CD177 antigen</i>	1,20	0,566
<b>Q6UX06</b>	<i>Olfactomedin-4</i>	1,69	0,568
<b>P12110</b>	<i>Collagen alpha-2(VI) chain</i>	0,93	0,569
<b>Q6PCB0</b>	<i>von Willebrand factor A domain-containing protein 1</i>	1,14	0,573
<b>P08253</b>	<i>72 kDa type IV collagenase</i>	1,22	0,583
<b>P07384</b>	<i>Calpain-1 catalytic subunit</i>	1,23	0,583
<b>Q9UHL4</b>	<i>Dipeptidyl peptidase 2</i>	0,89	0,593
<b>P20151</b>	<i>Kallikrein-2</i>	1,11	0,606
<b>P01834</b>	<i>Immunoglobulin kappa constant</i>	2,48	0,608
<b>P41222</b>	<i>Prostaglandin-H2 D-isomerase</i>	1,20	0,612
<b>P15309</b>	<i>Prostatic acid phosphatase</i>	0,89	0,612
<b>P36268</b>	<i>Inactive glutathione hydrolase 2</i>	1,09	0,616
<b>P09972</b>	<i>Fructose-bisphosphate aldolase C</i>	1,87	0,633
<b>P28907</b>	<i>ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 1</i>	1,88	0,658
<b>P19652</b>	<i>Alpha-1-acid glycoprotein 2</i>	2,01	0,666
<b>P18827</b>	<i>Syndecan-1</i>	1,20	0,670
<b>P12830</b>	<i>Cadherin-1</i>	1,11	0,679
<b>P14384</b>	<i>Carboxypeptidase M</i>	1,07	0,693
<b>Q9NZ08</b>	<i>Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1</i>	1,75	0,696
<b>Q9Y646</b>	<i>Carboxypeptidase Q</i>	1,14	0,704
<b>Q13438</b>	<i>Protein OS-9</i>	1,30	0,705
<b>Q16610</b>	<i>Extracellular matrix protein 1</i>	0,89	0,707
<b>Q9H4B8</b>	<i>Dipeptidase 3</i>	1,23	0,708
<b>P43251</b>	<i>Biotinidase</i>	1,06	0,710
<b>P60174</b>	<i>Triosephosphate isomerase</i>	1,14	0,726
<b>Q99538</b>	<i>Legumain</i>	0,92	0,727
<b>P16870</b>	<i>Carboxypeptidase E</i>	1,06	0,734
<b>P06865</b>	<i>Beta-hexosaminidase subunit alpha</i>	1,05	0,757
<b>P30086</b>	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	1,08	0,767
<b>O75874</b>	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic</i>	0,96	0,781
<b>P19801</b>	<i>Amiloride-sensitive amine oxidase [copper-containing]</i>	1,09	0,784
<b>P49913</b>	<i>Cathelicidin antimicrobial peptide</i>	1,49	0,785
<b>P00390</b>	<i>Glutathione reductase, mitochondrial</i>	1,32	0,785
<b>Q9UHC6</b>	<i>Contactin-associated protein-like 2</i>	1,07	0,797
<b>O75340</b>	<i>Programmed cell death protein 6</i>	1,11	0,798
<b>P07355</b>	<i>Annexin A2</i>	1,04	0,816
<b>O94813</b>	<i>Slit homolog 2 protein</i>	0,80	0,822
<b>Q96S96</b>	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 4</i>	1,10	0,824
<b>Q02809</b>	<i>Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1</i>	1,06	0,844
<b>O14672</b>	<i>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i>	1,05	0,850

Continua...

...continuação tabela suplementar.

<b>P32119</b>	<i>Peroxiredoxin-2</i>	0,97	0,851
<b>Q13449</b>	<i>Limbic system-associated membrane protein</i>	1,04	0,877
<b>P49327</b>	<i>Fatty acid synthase</i>	1,03	0,881
<b>P54802</b>	<i>Alpha-N-acetylglucosaminidase</i>	0,97	0,881
<b>P07858</b>	<i>Cathepsin B</i>	0,98	0,881
<b>P04406</b>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	0,97	0,884
<b>O00468</b>	<i>Agrin</i>	1,02	0,884
<b>Q14393</b>	<i>Growth arrest-specific protein 6</i>	1,01	0,915
<b>P12273</b>	<i>Prolactin-inducible protein</i>	1,03	0,916
<b>P07686</b>	<i>Beta-hexosaminidase subunit beta</i>	1,01	0,922
<b>O60888</b>	<i>Protein CutA</i>	0,96	0,931
<b>P15144</b>	<i>Aminopeptidase N</i>	0,98	0,937
<b>P05155</b>	<i>Plasma protease C1 inhibitor</i>	0,96	0,937
<b>P02649</b>	<i>Apolipoprotein E</i>	0,95	0,938
<b>P13716</b>	<i>Delta-aminolevulinic acid dehydratase</i>	1,03	0,942
<b>P04004</b>	<i>Vitronectin</i>	1,01	0,949
<b>P04217</b>	<i>Alpha-1B-glycoprotein</i>	0,98	0,950
<b>P13796</b>	<i>Plastin-2</i>	0,99	0,960
<b>P34096</b>	<i>Ribonuclease 4</i>	0,99	0,964
<b>P04066</b>	<i>Tissue alpha-L-fucosidase</i>	0,99	0,980
<b>P00491</b>	<i>Purine nucleoside phosphorylase</i>	0,99	0,983

**Anexo 2 – Tabela suplementar 2.** Média das concentrações de proteínas do plasma seminal de homens com TCGT pré e pós-orquiectomia.

<b>Amostra</b>	<b>Grupo</b>	<b>Concentração de proteínas (µg/mL)</b>	<b>Grupo</b>	<b>Concentração de proteínas (µg/mL)</b>
<b>1</b>	Pré-orquiectomia	25042,2	Pós-orquiectomia	23449,2
<b>2</b>	Pré-orquiectomia	33600,3	Pós-orquiectomia	26307,1
<b>3</b>	Pré-orquiectomia	20737,9	Pós-orquiectomia	24498,4
<b>4</b>	Pré-orquiectomia	30485,5	Pós-orquiectomia	19476,8
<b>5</b>	Pré-orquiectomia	28489,1	Pós-orquiectomia	23177,8
<b>6</b>	Pré-orquiectomia	27399,0	Pós-orquiectomia	16627,1
<b>7</b>	Pré-orquiectomia	28661,0	Pós-orquiectomia	31659,9
<b>8</b>	Pré-orquiectomia	25666,9	Pós-orquiectomia	24903,4
<b>9</b>	Pré-orquiectomia	38792,8	Pós-orquiectomia	25588,3
<b>10</b>	Pré-orquiectomia	27439,5	Pós-orquiectomia	29962,6
<b>11</b>	Pré-orquiectomia	31138,5	Pós-orquiectomia	26979,8
<b>12</b>	Pré-orquiectomia	25512,8	Pós-orquiectomia	32607,7
<b>13</b>	Pré-orquiectomia	19003,3	Pós-orquiectomia	29686,9
<b>14</b>	Pré-orquiectomia	16756,2	Pós-orquiectomia	37558,7
<b>15</b>	Pré-orquiectomia	20617,6	Pós-orquiectomia	22684,0
<b>16</b>	Pré-orquiectomia	18246,9	Pós-orquiectomia	28620,9
<b>17</b>	Pré-orquiectomia	23271,2	Pós-orquiectomia	24545,6

### Anexo 3 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ORQUIECTOMIA NO PERFIL DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL DE HOMENS PORTADORES DE TUMOR GERMINATIVO DE TESTÍCULO

**Pesquisador:** Maria Beatriz Ribeiro de Andrade

**Área Temática:** Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):  
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 60953616.2.0000.5505

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/EPM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.881.368

##### Apresentação do Projeto:

Nº CEP: 1404/2016 (parecer final)

O tumor de testículo, independente da linhagem, compromete a espermatogênese e causa alterações nos parâmetros seminais, como diminuição da concentração ou até a ausência total de espermatozoides no ejaculado. A orquiectomia via inguinal é o tratamento inicial padronizado para todos os pacientes portadores de tumor de testículo. Após esse procedimento, os pacientes podem ou não receber a indicação de tratamentos adjuvantes

como quimioterapia e/ou radioterapia e/ou linfadenectomia retroperitoneal. Todavia, a orquiectomia por si só pode levar a diminuição na capacidade de produção de espermatozoides. Ademais, as drogas quimioterápicas e a radioterapia atingem diretamente o processo da espermatogênese, eliminando ou reduzindo o número de células germinativas. O

efeito gonadotóxico destes tratamentos pode levar os indivíduos a se tornarem oligozoospermicos

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

**Bairro:** VILA CLEMENTINO

**CEP:** 04.023-061

**UF:** SP

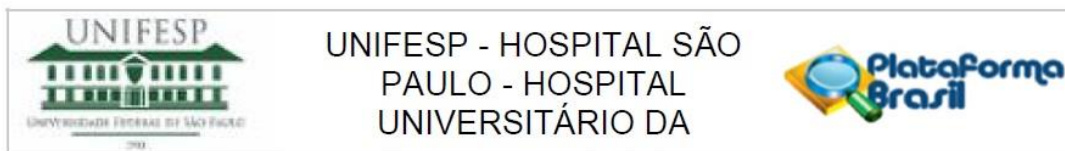
**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)5571-1062

**Fax:** (11)5539-7162

**E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com





Continuação do Parecer: 1.881.368

ou azoospermicos, e consequentemente inférteis, sendo esse o efeito colateral mais relevante para os jovens pacientes portadores de tumor de testículo. Entretanto, a análise seminal convencional, isoladamente, não é capaz de fornecer um diagnóstico de infertilidade, pois não é um preditor preciso de do sucesso reprodutivo, uma vez que, não aborda as propriedades fisiológicas e funcionais dos espermatozoides. Assim, é importante a realização da análise da qualidade funcional dos espermatozoides, por meio de técnicas que visam avaliar a fragmentação do DNA espermático, a atividade mitocondrial e a integridade do acrossoma. Em um estudo (dados enviados para publicação) realizado em homens com tumor de células germinativas de testículo foi observado que após a orquiectomia houve um aumento na atividade mitocondrial, diminuição da fragmentação do DNA espermático e da peroxidação lipídica do plasma seminal. Entretanto, estudos focando nos mecanismos moleculares envolvidos com alterações funcionais de espermatozoides poderiam fornecer um melhor entendimento acerca da melhora observada após a orquiectomia. Sendo assim, este estudo propõe avaliar o efeito da orquiectomia no perfil de proteínas do plasma seminal de pacientes portadores de tumor de células germinativas de testículo. Para isso será realizada a análise proteômica do plasma seminal de homens portadores de tumor de células germinativas de testículo pré e pós-orquiectomia realizada por meio da técnica de espectrometria de massas 2D nanoUPLC-ESI-MSE. Seguido da técnica de Western Blot como método confirmatório de proteínas

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar o efeito da orquiectomia no perfil de proteínas do plasma seminal de pacientes portadores de tumor de células germinativas de testículo

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: segundo o pesquisador, a colheita de sêmen deve ser realizada por masturbação em um recipiente plástico estéril. Este procedimento pode causar algum desconforto para os voluntários.

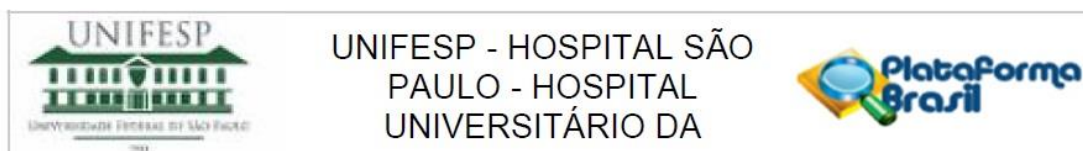
#### **Benefícios:**

Não existem benefícios para o voluntário em particular neste estudo.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de estudo com o objetivo acadêmico de Doutorado, vinculado ao DEPARTAMENTO DE

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14  
**Bairro:** VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.881.368

CIRURGIA / DISCIPLINA DE UROLOGIA da Unifesp, Campus São Paulo.

Orientador: Profª Dra. Deborah Montagnini Spaine e Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla

#### Material e método

.1. Pacientes e coleta das amostras Para a realização deste estudo prospectivo, serão utilizadas amostras de 30 pacientes portadores de tumor células germinativas de testículo pré orquiectomia e até 30 dias após orquiectomia, encaminhados para criopreservação da amostra seminal ao Banco de Células e Tecidos Germinativos do Setor Integrado de Reprodução Humana do Hospital São Paulo. As amostras serão colhidas em recipientes de polipropileno estéreis, por masturbação, após dois a cinco dias de abstinência ejaculatória, em área anexa ao laboratório de Andrologia, da Disciplina de Urologia, do Departamento de Cirurgia, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os fatores de exclusão desse estudo serão pacientes azoospermicos, com histórico de orquiectomia, com diagnóstico de tumor de testículo bilateral e que já tenham iniciado tratamento quimioterápico e/ou radioterápico. Não serão adotados outros fatores de exclusão por se tratar de um estudo pareado.

.2. Separação do plasma seminal Após a coleta e liquefação da amostra seminal, uma alíquota será utilizada para a análise dos parâmetros seminais, realizada de acordo com as recomendações do manual da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2010 e a análise da morfologia avaliada pelo critério estrito (43) e criopreservação da amostra. Após a realização da análise seminal uma alíquota de 500 µL será centrifugado a 800 xG

por trinta minutos para a separação do plasma seminal da fração celular. O sobrenadante será congelado e mantido a -20°C até o momento da análise proteômica. Previamente ao teste, o plasma seminal será descongelado e centrifugado a 16100 xG por uma hora a 4°C para remoção de debris celulares. Todos os reagentes utilizados nesse estudo serão

adquiridos da Sigma (Sigma Aldrich®, EUA), a não ser quando descrito. Para a realização deste estudo serão realizados:(i) Determinação da concentração total de proteínas da amostra pelo método de BCA (ácido bicinconínico);(ii) Digestão de proteínas com tripsina;(iii)Análise proteômica do plasma seminal por meio da técnica de espectrometria de massas 2D nanoUPLC-ESI-MSE;(iv) Western Blot como técnica confirmatória das proteínas;(v)

análise estatística dos resultados (t de Student - teste paramétrico e Wilcoxon - teste não paramétrico)

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

**Bairro:** VILA CLEMENTINO

**CEP:** 04.023-061

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)5571-1062

**Fax:** (11)5539-7162

**E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com





Continuação do Parecer: 1.881.368

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Documentos obrigatórios apresentados: folha de rosto, projeto de pesquisa, TCLE  
- apresentada carta da COEPHu/HSP junto ao cadastro do CEP-Unifesp;

**Recomendações:**

Nada consta

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Trata-se de respostas de pendências ao parecer original consubstanciado CEP nº 1.814.219 de 09/11/2016, quanto aos seguintes questionamentos abaixo:

1) Reformular o TCLE para o presente estudo, já que foi apresentado TCLE com título e descrição de outro estudo, e lembrar de incluir: - é necessário informar que o termo está sendo disponibilizado em 2 vias originais (não usar a palavra "cópia"), uma para ficar com o participante e outra para ficar com o pesquisador. - todas as folhas devem ser numeradas (ex: 1/4, 2/4, etc.) e rubricadas pelo pesquisador e pelo participante da pesquisa no momento da aplicação do TCLE.

Resposta: TCLE reformulado e anexado novamente na plataforma Brasil. Foi informado no TCLE que o termo será disponibilizado em 2 vias originais, nas quais, uma fica com o voluntário da pesquisa e a outra com o pesquisador. Todas as folhas foram numeradas de acordo com o proposto na pendência

CEP-UNIFESP: PENDÊNCIA ATENDIDA

2) Descrever os riscos e desconfortos dos procedimentos da pesquisa, assim como os seus benefícios, tanto no projeto como no formulário da Plataforma Brasil e no TCLE.

Resposta: Todos os riscos e desconfortos dos procedimentos da pesquisa, assim como os seus benefícios foram descritos no projeto como no formulário da Plataforma Brasil e no TCLE.

CEP-UNIFESP: PENDÊNCIA ATENDIDA

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (anualmente), e o relatório final, quando do término do estudo.

PARECER ACATADO PELO COORDENADOR "ad ref"

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14  
**Bairro:** VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.881.368

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_760510.pdf	07/12/2016 12:13:13		Aceito
Outros	RESPOSTASPENDENCIAS.pdf	07/12/2016 12:12:10	Maria Beatriz Ribeiro de Andrade	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeConsentimentolivreEsclarecidoCorretoCorrigido.pdf	07/12/2016 12:10:48	Maria Beatriz Ribeiro de Andrade	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	11/10/2016 09:33:49	Maria Beatriz Ribeiro de Andrade	Aceito
Outros	merged_document_3.pdf	07/08/2016 13:57:20	Maria Beatriz Ribeiro de Andrade	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento.pdf	07/08/2016 13:45:40	Maria Beatriz Ribeiro de Andrade	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	03/08/2016 22:04:52	Maria Beatriz Ribeiro de Andrade	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Avaliação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 22 de Dezembro de 2016

---

**Assinado por:**  
**Miguel Roberto Jorge**  
 (Coordenador)

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14  
**Bairro:** VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com

## **Anexo 4 – Termo de consentimento livre e esclarecido.**

### **Termo de Consentimento livre e Esclarecido**

#### **1. Título do projeto**

“Avaliação do efeito da orquiectomia no perfil de proteínas do plasma seminal de homens portadores de tumor germinativo de testículo”.

#### **2. Informações iniciais**

Todas as informações serão fornecidas para a sua participação voluntária neste estudo, que visa à avaliação do perfil de proteínas do plasma seminal (análise que visa avaliar o perfil de proteínas do plasma seminal por meio da análise proteômica por espectrometria de massas) de pacientes portadores de câncer de testículo.

#### **3. Procedimentos**

As amostras seminais deverão ser coletadas via masturbação para congelamento no laboratório/banco de criopreservação. Após a liquefação seminal será realizado o exame de espermograma (procedimento rotineiro); parte desta amostra será congelada e a porção restante passará por uma análise funcional dos espermatozoides (procedimento experimental).

#### **4. Desconfortos e riscos aos voluntários**

A colheita de sêmen deve ser realizada por masturbação em um recipiente plástico estéril. Este procedimento pode causar algum desconforto para você. A colheita de sêmen na sala de colheita do Laboratório de Urologia/Reprodução Humana do Hospital São Paulo pode ser constrangedora. O deslocamento até o local para a colheita também poderá ser inconveniente. Não haverá qualquer ajuda financeira para as despesas de transporte ou alimentação durante a sua estadia. **Não** existe risco de que a amostra de sêmen que você irá produzir possa gerar filhos. A amostra será utilizada **somente** para o espermograma e, o restante, para os testes envolvidos nesta pesquisa.

**5. Benefícios:** Não existem benefícios para você em particular neste estudo.

#### **6. Esclarecimentos sobre a pesquisa:**

Em qualquer etapa da pesquisa, o paciente voluntário terá acesso aos profissionais responsáveis para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora da pesquisa é a Biomédica Maria Beatriz Ribeiro de Andrade que pode ser encontrada no Laboratório de Reprodução Humana/Banco de Criopreservação da Unifesp, na Rua Napoleão de Barros, 628 Vila Clementino, São Paulo. CEP: 04024-002/ Telefones (11) 5084-3891.

Em caso de dúvidas e considerações sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), localizado na Rua Botucatu, 572-1º andar-cj14, Telefone: (11) 5571-1062, FAX: (11) 5539-7162 /E-mail: [cepunifesp@epm.br](mailto:cepunifesp@epm.br). O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) será disponibilizado em duas vias originais, sendo que, uma via ficará em posse do pesquisador e outra via fica em posse do voluntário da pesquisa.

#### **7. Direito de confiabilidade:**

Todas as informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente e mantendo a confiabilidade de todos os registros dos mesmos.

#### **8. Participação Voluntária**

A participação dos pacientes neste estudo é totalmente voluntária. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu trabalho na Instituição.

#### **9. Despesas e Compensações**

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à participação dos voluntários. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

#### **10. Danos pessoais**

Em caso de dano pessoal (lesão física) diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (anexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico disponível.

#### **11. Compromisso do pesquisador**

O pesquisador tem como compromisso, utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. O material após ser utilizado para a pesquisa será descartado de forma adequada (descarpack).

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Análise funcional dos espermatozoides de pacientes portadores de câncer de testículo pré e pós orquiectomia”

Eu discuti com a pesquisadora Maria Beatriz Ribeiro de Andrade sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei

retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Assinatura do paciente/representante legal

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Assinatura da testemunha

Para casos de voluntários menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento livre e Esclarecimento deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo